



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ανίχνευση μεταλλάξεων του *TNFRSF13B/TACI* σε ασθενείς με χρόνια
ρινοκολπίτιδα με ρινικούς πολύποδες**

Γεωργία Κ. Τσιούμα

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Σπελέτας Ματθαίος, Αναπληρωτής Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Επιβλέπων
- Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας
- Ευθυμία Πετεινάκη, Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην Ανοσολογία

Λάρισα, Νοέμβριος 2017



**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE**



**MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”**

MASTER THESIS

***TNFRSF13B/TACI* mutations in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps**

By

Georgia K. Tsiouma

Examining Committee:

- Matthaïos Speletas, Associate Professor of Laboratory Immunology (Supervisor)
- Anastasios Germenis, Professor of Laboratory Immunology
- Efthimia Peteinaki, Professor of Microbiology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Immunology

Larissa, November 2017

**Στους γονείς μου Κων/νο και Παρασκευή
και την αδερφή μου Κατερίνα,
για όλη τη στήριξη και την αγάπη τους...**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος.....	6
Συντμήσεις.....	8
Περίληψη.....	10
Abstract.....	11
Εισαγωγή	12
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	13
1. Ο υποδοχέας TACI και οι συνδέτες του	14
1.1. Δομή γονιδίου	15
1.2. Δομή υποδοχέα.....	15
1.3. Έκφραση του TACI.....	16
1.4. Οι μορφές των συνδετών που ενεργοποιούν τον TACI.....	17
1.5. Ο βιολογικός ρόλος του TACI.....	18
1.6. Μεταλλάξεις του γονιδίου <i>TNFRSF13B</i>	20
1.7. Ο ρόλος του TACI στις πρωτοπαθείς αντισωματικές ανοσοανεπάρκειες.....	21
1.8. Ο ρόλος του TACI σε άλλες νοσολογικές οντότητες.....	22
2. Χρόνια Ρινοκολπίτιδα (CRS).....	24
2.1. Υπότυποι της CRS.....	25
2.2. Αιτιοπαθογένεια της CRS.....	25
2.3. Αιτιοπαθογένεια της CRSwNP.....	27
2.4. Κλινική εικόνα- Ταξινόμηση.....	29
2.5. Θεραπεία της CRSwNP.....	30
3. Σκοπός της παρούσας μελέτης.....	31
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	32
1. Ασθενείς και μάρτυρες.....	33
2. Υλικά	34
2.1. Αντιδραστήρια και αναλώσιμα υλικά.....	34
3. Μεθοδολογία της έρευνας.....	37
3.1 Απομόνωση γονιδιακού DNA από ολικό περιφερικό αίμα.....	37
3.2 Μοριακή μελέτη.....	38
3.2.1 PCR για το γονίδιο <i>TNFRSF13B/TACI</i>	38
3.2.2 Ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε γέλη αгарόζης.....	39

3.2.3 Καθαρισμός των προϊόντων PCR προς ανάλυση αλληλουχίας βάσεων.....	40
3.3 Ανάλυση αλληλουχίας βάσεων κατά Sanger.....	42
3.4 Στατιστική ανάλυση.....	42
4. Αποτελέσματα.....	43
5. Συζήτηση	49
Βιβλιογραφία	51

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η χρόνια ρινοκολπίτιδα με πολύποδες, αν και καλοήθης πάθηση, αποτελεί μια χρόνια νόσο με σημαντικές επιπτώσεις στην καθημερινή δραστηριότητα των ασθενών. Δεδομένου ότι η αιτιοπαθογένειά της δεν είναι πλήρως γνωστή, η θεραπεία της νόσου παραμένει κατά βάση συμπτωματική. Ωστόσο σε μία ικανή μερίδα των ασθενών δεν θα επιτευχθεί έλεγχος νόσου, θέτοντας ισχυρούς προβληματισμούς στο θεράποντα. Έχοντας βρεθεί στην παραπάνω θέση, η ευκαιρία να εργαστώ πάνω σε ένα ερευνητικό πρωτόκολλο που αναζητά μηχανισμούς που μπορεί να συμμετέχουν στην αιτιοπαθογένεια της νόσου, ήταν μια μεγάλη πρόκληση και μια τεράστια ευκαιρία.

Είχα την τύχη να έχω εξαιρετικούς καθοδηγητές σε όλη τη διαδρομή που με συμβούλεψαν, με υποστήριξαν και με βοήθησαν ουσιαστικά.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστώ τον Καθηγητή Αναστάσιο Γερμενή, που με δέχθηκε στο Εργαστήριο και μου προσέφερε την υλικοτεχνική εργαστηριακή υποδομή για να ολοκληρώσω τη μελέτη. Επιπρόσθετα, είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων για τη διαρκή καθοδήγηση και στήριξη που μου προσέφερε όλο αυτό το διάστημα.

Θα ήθελα, επιπλέον, να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της πτυχιακής, Αναπληρωτή Καθηγητή Ματθαίο Σπελέτα για την συνεχή καθοδήγηση, τις καίριες παρεμβάσεις καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια σε όλα τα στάδια της μελέτης, από τον αρχικό σχεδιασμό έως τη συγγραφή της πτυχιακής. Η συνεχής υποστήριξη, η υπομονή, η συμπαράσταση και οι πολύτιμες συμβουλές του υπήρξαν πηγή έμπνευσης για μένα.

Ευχαριστώ, επίσης, την Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ευθυμία Πετεινάκη για το υλικό των ασθενών που μου παρείχε και την άψογη συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή ΩΡΛ Χαράλαμπο Σκουλάκη και τον Επιμελητή Α' ΩΡΛ Βασίλειο Λαχανά για την πολύτιμη βοήθεια τους στη συλλογή των δειγμάτων των ασθενών.

Ευχαριστώ από καρδιάς τις Ειρήνη Σεβδαλή, Γερασιμίνα Τσιντή και Ευαγγελία Καραμούτη για την αμέριστη βοήθεια, τη στήριξη, την ενθάρρυνση καθώς επίσης και την τεχνογνωσία που μου προσέφεραν στα πρώτα βήματά μου στο χώρο αυτόν. Ήταν πάντα διαθέσιμες και προσιτές από τις πρώτες ημέρες παρουσίας μου στο εργαστήριο. Χάρη στη βοήθεια τους κατάφερα να φέρω εις πέρας τις εργασίες που μου ανατέθηκαν και να ξεπεράσω τα προβλήματα που τυχόν αντιμετώπισα στην ολοκλήρωσή τους. Στη συνέχεια, ευχαριστώ τους Αδάμ Μολυβδά και Ζωή Φλώρου για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την άψογη συνεργασία που είχα μαζί τους.

Ευχαριστώ, τέλος, τη γραμματέα του εργαστηρίου Γεσθημανή Καραϊσκού για την αδιάλειπτη παρουσία της και τη συμμετοχή της σαν κρίσιμο μέλος του εργαστηρίου.

Κρίσιμη και ιδιαίτερος σημαντική ήταν, φυσικά, και η συμβολή της οικογένειάς μου, των γονιών μου Κων/νου και Παρασκευής και ιδιαίτερος της αδερφής μου Κατερίνας, στην ολοκλήρωση αυτού του μεταπτυχιακού προγράμματος, τους οποίους ευχαριστώ ιδιαίτερα για τη στήριξη που μου έχουν προσφέρει.

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά το χρονικό διάστημα Νοέμβριος 2015 με Οκτώβριο 2017, στο πλαίσιο των μεταπτυχιακών μου σπουδών στο πρόγραμμα «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής».

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

APC (antigen-presenting cell)	Αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο
APRIL (a proliferation-inducing ligand)	Συνδέτης που επάγει τον πολλαπλασιασμό
BAFF (B-cell activating factor)	Παράγοντας ενεργοποίησης των B κυττάρων
BAFFR (B-cell activating factor-receptor)	Υποδοχέας του παράγοντα ενεργοποίησης των B κυττάρων
BCMA (B-cell maturation antigen)	Αντιγόνο ωρίμανσης των B κυττάρων
BcR (B-cell receptor)	Υποδοχέας των B-κυττάρων
Blys (B-lymphocyte stimulator)	Διεγέρτης B λεμφοκυττάρων
Bp (Base pair)	Ζεύγη βάσεων
CAML (Calcium modulating ligand)	Συνδέτης που συμμετέχει στη ρύθμιση ασβεστίου
CD (Clusters of Differentiation)	Αντιγόνα διαφοροποίησης
CLL (Chronic Lymphocytic Leukemia)	Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία
CRD (Cysteine rich domain)	Πλούσια σε κυστεΐνη περιοχή
CRS (Chronic Rhinosinusitis)	Χρόνια Ρινοκολπίτιδα
CRSsNP (Chronic Rhinosinusitis without Nasal Polyps)	Χρόνια Ρινοκολπίτιδα χωρίς ρινικούς πολύποδες
CRSwNP (Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps)	Χρόνια Ρινοκολπίτιδα με ρινικούς πολύποδες
CVID (Common variable immunodeficiency)	Κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια
DCs (Dendritic cells)	Δενδριτικά κύτταρα
ECRS (Eosinophilic chronic rhinosinusitis)	Ηωσινοφιλική χρόνια ρινοκολπίτιδα
non-ECRS (non- eosinophilic chronic rhinosinusitis)	Μη ηωσινοφιλική χρόνια ρινοκολπίτιδα
GC (Geminal center)	Βλαστικό κέντρο
HSPGs (Heparan sulfate proteoglycans)	Πρωτεογλυκάνες της θειϊκής ηπαράνης
IFN (interferon)	Ιντερφερόνη

IL (Interleukin)	Ιντερλευκίνη
NF-κB pathway (Nuclear factor-kappa B pathway)	Μονοπάτι του πυρηνικού παράγοντα κΒ
PCR (Polymerase Chain Reaction)	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PG (prostaglandin)	Προσταγλανδίνη
sIgAD (selective IgA Deficiency)	Εκλεκτική ανεπάρκεια της ανοσοσφαιρίνης Α
SLE (Systemic lupus erythematosus)	Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος
SNPs (Single nucleotide polymorphisms)	Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί
TACI (Transmembrane Activator and CAML Interactor)	Διαμεμβρανική πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με συνδέτη που συμμετέχει στη ρύθμιση του ασβεστίου
TGF (Transforming growth factor)	Μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας
Th (T-helper cell)	Βοηθητικό Τ-λεμφοκύτταρο
TLR (Toll-like receptor)	Υποδοχέας τύπου toll
TNF (Tumor Necrosis Factor)	Παράγοντας νέκρωσης του όγκου
TNFRSF13B (TNF receptor superfamily member 13B)	Μέλος 13B της υπεροικογένειας των υποδοχέων των παραγόντων νέκρωσης του όγκου
TRAF (Tumor necrosis factor receptor- associated factor)	Παράγοντας σχετιζόμενος με τον υποδοχέα των παραγόντων νέκρωσης του όγκου
Treg (T-regulatory cell)	Ρυθμιστικό Τ-λεμφοκύτταρο
ΜΣΑΦ	Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η αιτιοπαθογένεια της χρόνιας ρινοκολπίτιδας με ρινικούς πολύποδες (CRSwNP) δεν είναι πλήρως γνωστή, ωστόσο μελέτες στρέφονται στην επίδραση διαταραχών της χυμικής ανοσίας. Τελευταία αναγνωρίστηκε αυξημένη έκφραση του συνδέτη BAFF και της πρωτεΐνης TACI σε δείγματα ρινικών πολυπόδων, ενώ μεταλλάξεις του *TNFRSF13B/TACI* έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση καλοήθους λεμφοϋπερπλασίας.

Σκοπός: Ο έλεγχος μεταλλάξεων του *TNFRSF13B/TACI* σε ασθενείς με CRSwNP.

Υλικό- Μέθοδοι: Μελετήθηκαν 44 ασθενείς με CRSwNP (άνδρες/γυναίκες: 33/11). Ο μέσος όρος ηλικίας ήταν 52,5 έτη (εύρος ηλικίας: 16-83). Επιπλέον μια ομάδα 259 υγιών χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου (άνδρες/γυναίκες: 162/97) με μέσο όρο ηλικίας 69,2 έτη και εύρος ηλικίας 19-86 έτη. Στους ασθενείς έγινε PCR- sequencing του γονιδίου *TNFRSF13B/TACI*, ενώ στα δείγματα των υγιών μαρτύρων είχε πραγματοποιηθεί ανίχνευση των κοινών πολυμορφισμών p.P251L (rs34562254) και p.V220A (rs56063729).

Αποτελέσματα: Η ανάλυση αλληλουχίας βάσεων του γονιδίου *TNFRSF13B/TACI* στους ασθενείς με CRSwNP, δεν αποκάλυψε παθογόνες μεταλλάξεις. Ωστόσο ανιχνεύτηκαν οι δύο κοινές παρανοηματικές (missense) μεταλλάξεις/ πολυμορφισμοί (p.P251L και p.V220A), τρεις σιωπηλοί πολυμορφισμοί [p.Thr27= (rs8072293), p.Pro97= (rs35062843) και p.Ser277= (rs11078355)] και τέσσερις ιντρονικοί πολυμορφισμοί [c.445+25A>C (rs2274892), c.632-139T>G (rs11652843), c.632-60T>C (rs11652811) και c.200-70C>T (rs537951875)], που ήδη έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία.

Συμπέρασμα: Οι μεταλλάξεις του *TNFRSF13B/TACI* δε φαίνεται να παίζουν αιτιοπαθογενετικό ρόλο στην ανάπτυξη της CRSwNP.

ABSTRACT

Introduction: The pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) is not fully understood. Recent studies identified an increased expression of BAFF and TACI in nasal polyps samples, while *TNFRSF13B/TACI* mutations have been found in benign lymphoproliferation conditions.

Aim: Analysis of *TNFRSF13B/TACI* mutations in patients with CRSwNP.

Materials/ Methods: We studied 44 patients with CRSwNP (male/female: 33/11) with mean age 52,5 years (range: 16-83). A group of 259 individuals without a history of recurrent infections and autoimmune disorders (male/female 162/97, mean age: 69,2 years; range 19-86) was served as healthy control group to detect the prevalence of common *TNFRSF13B/TACI* variants in the general Greek population. The molecular analysis of *TNFRSF13B/TACI* gene in the patients with CRSwNP was performed using PCR-sequencing and in the samples of the control group was performed a detection of the common polymorphisms p.P251L (rs34562254) and p.V220A (rs56063729).

Results: The analysis of the *TNFRSF13B/TACI* gene in the patients with CRSwNP, did not reveal pathogenic mutations. Although we detected the two common missense mutations/ polymorphisms (p.P251L and p.V220A), three silent polymorphisms [p.Thr27= (rs8072293), p.Pro97= (rs35062843) and p.Ser277= (rs11078355)] and four intronic polymorphisms [c.445+25A>C (rs2274892), c.632-139T>G (rs11652843), c.632-60T>C (rs11652811) and c.200-70C>T (rs537951875)], already described in the literature.

Conclusion: *TNFRSF13B/TACI* mutations might not play a role in the pathogenesis of CRSwNP.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η CRSwNP αποτελεί μία χρόνια φλεγμονώδη πάθηση της ρινός και των παραρρινίων κόλπων, με επίπτωση 0,2-4,3%. Η αιτιοπαθογένεια της νόσου δεν είναι πλήρως γνωστή και φαίνεται πως είναι πολύπλοκη, πολυπαραγοντική με συμμετοχή εξωγενών και ενδογενών παραγόντων (1). Μία υπόθεση που έχει περιγραφεί είναι πως οι διαταραχές της φυσικής αλλά και της επίκτητης ανοσίας στο βλεννογόνο του ξενιστή μπορεί να οδηγήσουν στην εκδήλωση CRSwNP, ενώ κάποιοι υποστηρίζουν πως οι ασθενείς με CRS εμφανίζουν κάποιας μορφής ανοσοανεπάρκεια (2)

Από την άλλη πλευρά η χυμική ανοσία μεσολαβείται από τα B κύτταρα, τα οποία μέσω των αντισωμάτων που παράγουν, προστατεύουν τον οργανισμό από μεγάλη ποικιλία παθογόνων. Η καταστροφή των διαφόρων αντιγόνων επιτυγχάνεται με την κινητοποίηση διαφορετικών κατά περίπτωση δραστικών μηχανισμών, ενώ η ανεπαρκής ανάπτυξη, διαφοροποίηση ή λειτουργία των B κυττάρων έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί σε ανοσοανεπάρκεια, κακοήθεια, αυτοανοσία και αλλεργία (3).

Η ανάπτυξη και διαφοροποίηση των B κυττάρων αποτελεί μια ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία, αποτελούμενη από μεγάλο αριθμό διακριτών σταδίων, καθένα από τα οποία χαρακτηρίζεται από την έκφραση συγκεκριμένων επιφανειακών και ενδοκυττάρων μορίων. Τα B κύτταρα παράγονται και ωριμάζουν στο μυελό των οστών. Τα ανώριμα B κύτταρα, μετά τη σύνθεση λειτουργικής IgM, εγκαταλείπουν το μυελό των οστών και εισέρχονται στο σπλήνα, όπου λαμβάνουν σήματα επιβίωσης μέσω του BAFFR. Μετά την επαφή τους με το αντιγόνο, πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα και B κύτταρα μνήμης. Η ενεργοποίηση των B κυττάρων επάγει συστατικά της ισοτυπικής μεταστροφής, όπως το TACI, που αποτελεί σημαντικό υποδοχέα για την επιβίωση των B κυττάρων.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

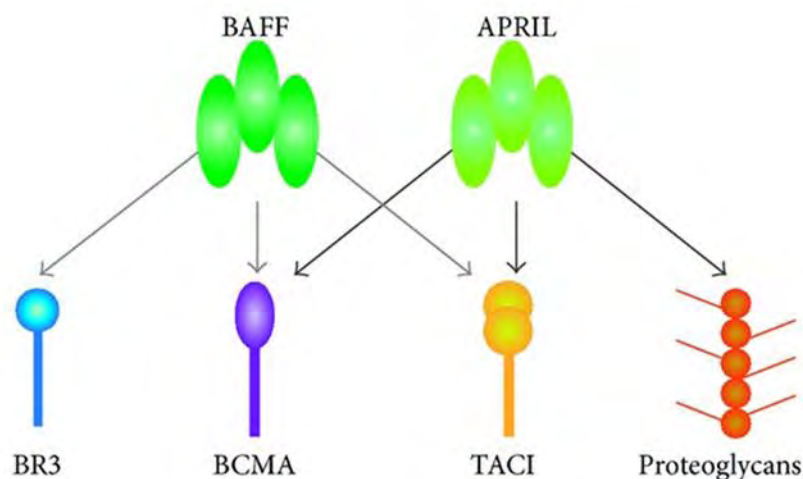
1. Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ TACI ΚΑΙ ΟΙ ΣΥΝΔΕΤΕΣ ΤΟΥ

Ο TACI είναι μέλος των υποδοχέων της οικογένειας TNF, μία κατηγορία υποδοχέων που ρυθμίζει την επιβίωση και την απόπτωση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο υποδοχέας TACI εκφράζεται στην επιφάνεια των ώριμων B κυττάρων και των πλασματοκυττάρων (4). Είναι ένας ρυθμιστής που επηρεάζει πολλαπλά γεγονότα στην ανοσιακή απάντηση, ελέγχοντας αντισωματικές απαντήσεις και συμμετέχοντας στην ισοτυπική μεταστροφή και την ομοιόσταση των B κυττάρων (5). Αλληλεπιδρά με δύο συνδέτες, τον BAFF (επίσης γνωστός και ως Blys, THANK, TALL-1 και zTNF4) και τον APRIL (γνωστό επίσης και ως TNSF13A, TALL-2 και TRDL-1) (6-8).

Ο BAFF είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II που ανήκει στην οικογένεια TNF. Παράγεται κυρίως από τα κύτταρα της μυελικής σειράς όπως μονοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα και δενδριτικά κύτταρα (DCs) (9). Μία πληθώρα κυτταροκινών όπως η IFN- γ , ο TGF- β και η IFN- α , καθώς επίσης και τα οιστρογόνα επηρεάζουν την παραγωγή και την έκφρασή του (10). Εμφανίζεται σε δύο μορφές, τη διαλυτή και τη συνδεδεμένη με μεμβράνη μορφή. Αποτελεί παράγοντα επιβίωσης των B κυττάρων ο οποίος, εκτός από τον υποδοχέα TACI, συνδέεται επίσης με τον BAFFR και τον BCMA (4, 5).

Ο APRIL αποτελεί επίσης μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II που ανήκει στην οικογένεια TNF. Παράγεται κυρίως από κύτταρα της μυελικής σειράς, αν και μελέτες έχουν δείξει έκφρασή του και σε νεοπλασματικά κύτταρα (9). Ο APRIL επάγει την ισοτυπική μεταστροφή των ανοσοσφαιρινών (11). Η διαφορά του με το BAFF είναι πως δεν εντοπίζεται στην επιφάνεια των κυττάρων (12). Δύναται να συνδεθεί με τον TACI, τον BCMA και τις πρωτεογλυκάνες (HSPGs), όχι όμως με τον BAFFR (4, 5) (Εικόνα 1).

Ο BAFFR συνδέεται αποκλειστικά με τον BAFF και είναι ο υποδοχέας που μεσολαβεί της ωρίμανσης και επιβίωσης των παρθένων B κυττάρων. Ο BCMA εμφανίζει υψηλότερη συγγένεια για τον APRIL από ότι για τον BAFF και συμμετέχει στην επιβίωση των πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών. Ο TACI εμφανίζει υψηλή συγγένεια για τον BAFF και τον APRIL, αλλά επίσης, αλληλεπιδρά και με τις HSPGs (5).



Εικόνα 1: Οι υποδοχείς των BAFF και APRIL. Ο BAFF συνδέεται κυρίως με τον BAFFR (BR3) αλλά επίσης και με τον BCMA και τον TACI. Ο APRIL συνδέεται με τον TACI, τον BCMA και τις HSPGs, αλλά όχι με τον BAFFR (από Tobon και συν.) (13).

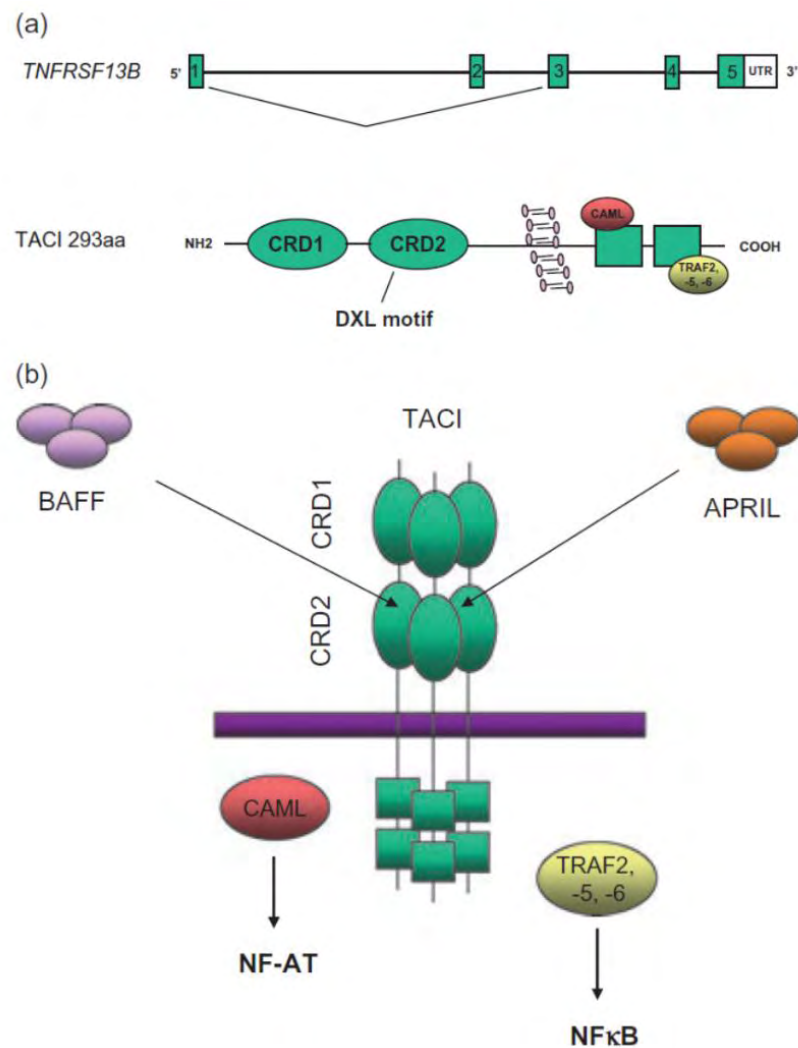
1.1 ΔΟΜΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ

Η πρωτεΐνη TACI κωδικοποιείται από ένα γονίδιο (*TNFRSF13B*, TNF receptor superfamily member 13B), που έχει χαρτογραφηθεί στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 17, στη χρωμοσωμική θέση 17p11.2, που αποτελεί συχνά στόχο μεταλλάξεων (14). Αποτελείται από 5 εξόνια, εκ των οποίων το εξόνιο 1 αποτελείται από 340 ζεύγη βάσεων (bp), το εξόνιο 2 από 319, το εξόνιο 3 από 635, το εξόνιο 4 από 540 και το εξόνιο 5 από 717 βάσεις. Το μήκος του mRNA είναι 1377bp και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 293 αμινοξέων με μοριακό βάρος 32,34 kD (Εικόνα 2).

1.2. ΔΟΜΗ ΥΠΟΔΟΧΕΑ

Ο υποδοχέας TACI είναι μια τύπου III διαμεμβρανική πρωτεΐνη, που αποτελείται από 293 αμινοξέα. Το αμινοτελικό άκρο του υποδοχέα είναι εξωκυττάριο και αποτελείται από 166 αμινοξέα, το διαμεμβρανικό τμήμα αποτελείται από 20 και το ενδοκυττάριο τμήμα από 107 αμινοξέα (15). Στη δομή της πρωτεΐνης αναγνωρίζονται δύο περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνες (CRDs), χαρακτηριστικές της TNF υπερικογένειας, οι οποίες είναι μεταξύ τους κατά 50% όμοιες (16). Το πρώτο τμήμα επαναλήψεων κυστεΐνης (CRD1) συμμετέχει στον πολυμερισμό του υποδοχέα, ενώ το δεύτερο (CRD2) είναι εκείνο στο οποίο προσδένονται οι συνδέτες με υψηλή

συγγένεια. Στο ενδοκυττάριο τμήμα του περιέχει θέσεις δέσμευσης για τις πρωτεΐνες TRAF και την πρωτεΐνη CAML (15) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Η γονιδιακή οργάνωση και η δομή της πρωτεΐνης TACI (από Bacchelli και συν.) (15).

1.3 ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ TACI

Ο TACI εκφράζεται κυρίως στα B κύτταρα και συγκεκριμένα στα CD27⁺ B κύτταρα μνήμης, στα πλασματοκύτταρα των αμυγδαλών και του μυελού των οστών, σε ένα μέρος των ενεργοποιημένων CD27 κυττάρων εκτός του βλαστικού κέντρου, στα μονοκύτταρα, στα δενδριτικά κύτταρα και σε ένα μέρος των παρθένων B κυττάρων του αίματος και των αμυγδαλών (4). Έχει επίσης υποστηριχτεί πως ο TACI εκφράζεται και από ένα μέρος των T κυττάρων χωρίς όμως να είναι ακόμη γενικά αποδεκτή αυτή η θεωρία (16). Ο TACI επιπλέον φαίνεται να

εκφράζεται στα μακροφάγα και να μεσολαβεί στην επιβίωση τους, ερμηνεύοντας έτσι την έκφραση του TACI σε ιστούς όπου ο αριθμός των B κυττάρων είναι συνήθως χαμηλός (17).

Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης TACI ρυθμίζονται από μια πληθώρα παραγόντων που συνεχώς υπόκεινται σε μεταβολές. Οι Schatorje et al. περιγράφουν πως τα επίπεδα των TACI+ B κυττάρων αυξάνονται με την ηλικία έως την ενηλικίωση (18). Επιπλέον η έκφραση του TACI είναι μειωμένη στα B κύτταρα του ομφάλιου αίματος των πρόωρων νεογνών (19). Στα νεογέννητα τα επίπεδα των TACI, BCMA και APRIL είναι σε χαμηλά επίπεδα, δεδομένης της έλλειψης πλασματοκυττάρων .

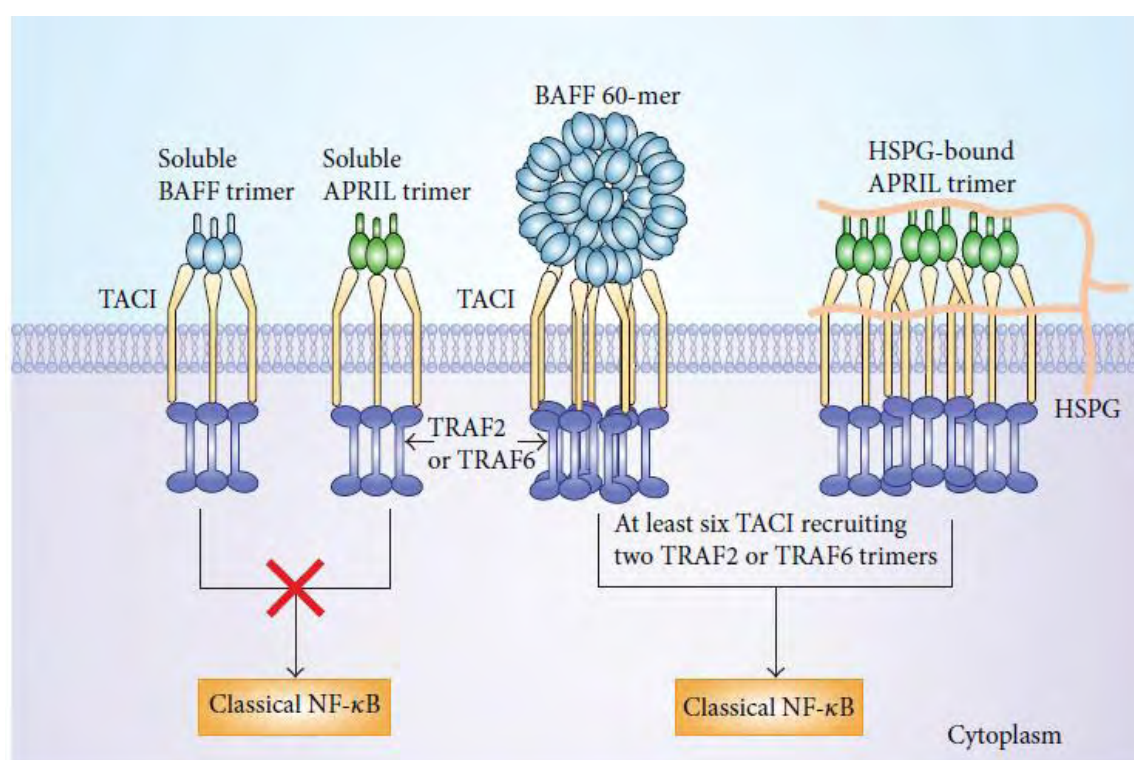
Πέραν της μεμβρανικής μορφής, ο TACI συναντάται και σε διαλυτή μορφή, τα επίπεδα της οποίας είναι αυξημένα στο SLE, τη CLL και τη CVID (17, 18). Η δράση της διαλυτής μορφής, αν και δεν είναι πλήρως ξεκάθαρη, φαίνεται πως συνίσταται στον ανταγωνισμό της σύνδεσης του BAFF ή του APRIL στους επιφανειακούς υποδοχείς τους. Δεδομένου πως τα επίπεδα του BAFF στο πλάσμα είναι αυξημένα σε ασθενείς με SLE, CLL και CVID, τα αυξημένα επίπεδα της διαλυτής μορφής του TACI μπορεί να σχετίζονται με μηχανισμούς ανατροφοδότησης (feedback) μέσω των οποίων ρυθμίζεται η δραστηριότητα του BAFF (1).

1.4 ΟΙ ΜΟΡΦΕΣ ΤΩΝ ΣΥΝΔΕΤΩΝ ΠΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥΝ ΤΟΝ TACI

Όπως προαναφέρθηκε ο BAFF εντοπίζονται σε δύο μορφές, τη διαλυτή και τη συνδεδεμένη με τη μεμβράνη μορφή. Ο συνδεδεμένος με τη μεμβράνη BAFF διασπάται, δημιουργώντας έτσι τη διαλυτή του μορφή. Στη διαλυτή του μορφή ο BAFF εμφανίζεται κυρίως με τη μορφή ομοτριμερών. *In vitro* μελέτες δείχνουν πως η σύνδεση είκοσι τριμερών BAFF οδηγεί στο σχηματισμό ενός εξηνταμερούς BAFF, με δομή παρόμοια ιού σε ουδέτερο ή αλκαλικό pH. Σε όξινο pH το εξηνταμερές BAFF διασπάται σε τριμερή (20).

Ομοίως με τον BAFF, ο διαλυτός APRIL κυρίως εμφανίζεται με τη μορφή ομοτριμερών, ενώ η σύνθεση εξηνταμερούς APRIL δεν είναι δυνατή. Ωστόσο τα τριμερή APRIL συνδέονται με τις HSPGs (21). Οι HSPGs συνδεόμενες στο APRIL και TACI, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του APRIL-TACI μονοπατιού, το οποίο συμμετέχει στην αιτιοπαθογένεια του πολλαπλού μυελώματος (22). Έχουν περιγραφεί επίσης, ετεροτριμερή BAFF-APRIL σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και SLE, τα οποία εικάζεται πως αποτελούν ρυθμιστικό μηχανισμό feedback του οργανισμού σε απάντηση των υψηλών επιπέδων BAFF που αναγνωρίζονται στις παραπάνω νόσους (23).

Το εξηνταμερές BAFF και το πολυμερισμένο APRIL είναι ικανά να ενεργοποιήσουν τον TACI. Οι τριμερείς μορφές των συνδετών BAFF και APRIL, παρά το γεγονός ότι είναι ικανές να συνδεθούν με τον TACI, δεν είναι ικανές όμως να τον ενεργοποιήσουν (24). Ο TACI αρχικά χρήζει σύνδεσης με τον TRAF2 ή TRAF6, οι οποίοι είναι τριμερείς. Δύο τριμερή μόρια TRAF χρειάζεται να συνδεθούν με τουλάχιστον έξι μόρια TACI για την ενεργοποίηση του κλασσικού μονοπατιού NF-κΒ (25) (Εικόνα 3).

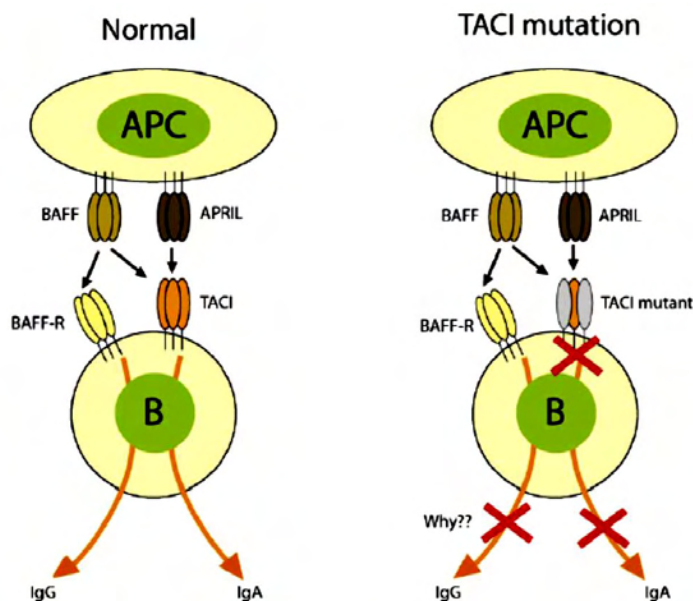


Εικόνα 3: Οι μορφές των συνδετών που ενεργοποιούν τον TACI (από Zhang και συν) (4).

1.5 Ο ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ TACI

Η πρωτεΐνη TACI διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση και τη διαφοροποίηση των B κυττάρων σε πλασματοκύτταρα (26). Μελέτες βασιζόμενες στο γεγονός πως τα TACI^{-/-} ποντίκια εμφανίζουν αύξηση στον αριθμό των κυκλοφορούντων B κυττάρων, με αποτέλεσμα την εκδήλωση σπληνομεγαλίας, λεμφωμάτων και αυτοάνοσων εκδηλώσεων, προτείνουν πως ο TACI αποστέλλει και σήματα απόπτωσης, συμβάλλοντας στην ομοιοστασία του B- κυτταρικού πληθυσμού (27). Η εμφάνιση αυτοανοσίας και λεμφοϋπερπλασιών εκτιμάται από διάφορες μελέτες πως οφείλεται στην αυξημένη BAFFR σηματοδότηση σε απουσία TACI, δεδομένου πως κάτω από φυσιολογικές

συνθήκες ο TACI ανταγωνίζεται τον BAFFR για τη σύνδεση του BAFF, με αποτέλεσμα να περιορίζει την επίδραση του BAFFR στην επιβίωση των B κυττάρων (28).



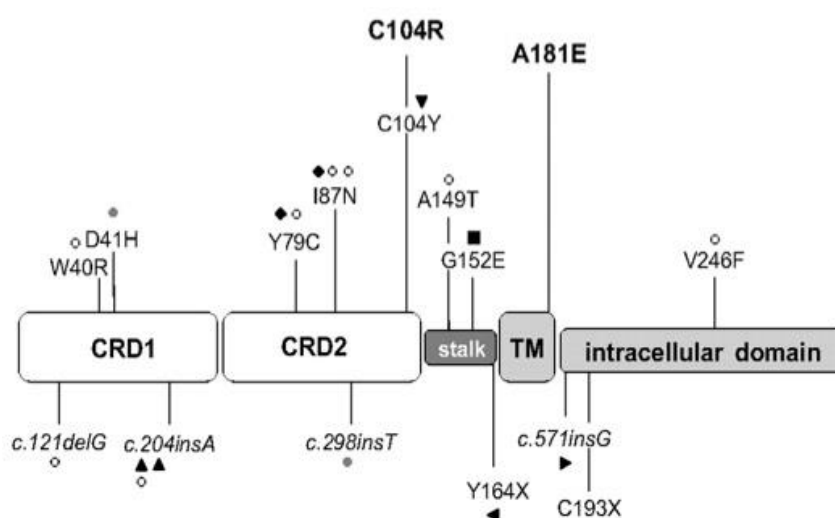
Εικόνα 4: Ο υποδοχέας TACI και η συμμετοχή του στην ισοτυπική μεταστροφή .

Ο υποδοχέας TACI συμμετέχει στην ισοτυπική μεταστροφή σε IgA, μετά από τη σύνδεσή του με τους BAFF και APRIL. Ωστόσο οι μεταλλάξεις του *TNFRSF13B* επιδρούν και στην ισοτυπική μεταστροφή σε IgG, χωρίς να είναι γνωστός ο μηχανισμός, μιας και *in vitro* η ενεργοποίηση του BAFFR αρκεί για την παραγωγή της IgG (απο Berglund και συν.) (29).

Επιπλέον, ο TACI συμμετέχει στην ισοτυπική μεταστροφή των ανοσοσφαιρινών, ανεξάρτητα από τη δράση της πρωτεΐνης CD40 (30). Η μεταστροφή σε IgA φαίνεται μάλιστα να εξαρτάται αποκλειστικά από το TACI, καθώς ποντίκια ανεπαρκή σε TACI και APRIL έχουν μειωμένα επίπεδα IgA στον ορό (31) (Εικόνα 4). Η συμβολή του TACI στη διαφοροποίηση των B κυττάρων και την παραγωγή ανοσοσφαιρινών αποδεικνύεται και σε κυτταρικές σειρές που είναι ήδη ενεργοποιημένη η πρωτεΐνη CD40 και ο υποδοχέας TLR4. Έχει παρατηρηθεί επίσης, πως η ενεργοποίηση του TLR οδηγεί σε υπερέκφραση του TACI στα B κύτταρα, συνδέοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τη φυσική ανοσία με τη μεσολαβούμενη από τον TACI ενεργοποίηση των B κυττάρων (32). Επίσης ο TACI συμμετέχει στην απάντηση έναντι πολυσακχαριτών των μικροβίων. Τα B κύτταρα της οριακής ζώνης του σπλήνα απαντούν σε τέτοιου είδους αντιγόνα, αυξάνοντας την επιφανειακή έκφραση του TACI, η οποία μπορεί να αλληλεπιδράσει αποτελεσματικά με τους συνδέτες του που εκκρίνονται από τα δενδριτικά κύτταρα (29). *In vitro* φαίνεται πως τα TACI $-/-$ ποντίκια δεν μπορούν να αντιμετωπίσουν θυμοεξαρτώμενα αντιγόνα τύπου II (33).

1.6 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *TNFRSF13B*

Οι μεταλλάξεις του *TNFRSF13B* που έχουν περιγραφεί ως τώρα είναι μη νοηματικές (nonsense), παρανοηματικές (missense) ή μετατοπίσεις του πλαισίου ανάγνωσης (frameshift). Δεν έχουν περιγραφεί μεγάλες ελλείψεις ή διπλασιασμοί. Από τις μεταλλάξεις που έχουν περιγραφεί, οι C104R, A181E, D68X και R202H φαίνεται πως σχετίζονται με τη CVID και την sIgAD (Εικόνα 5) (34, 35). Ωστόσο έχουν περιγραφεί και σε έναν αριθμό υγιών χωρίς υπογαμμασφαιριναιμία (36, 37).



Εικόνα 5: Κατανομή ορισμένων μεταλλάξεων του *TNFRSF13B* στην πρωτεΐνη TACI (από Salzer και συν.) (35).

Οι μεταλλάξεις του TACI ανιχνεύονται στο 10-20% των ασθενών με CVID και έχουν συσχετιστεί με νόσο είτε με σωματικό υπολειπόμενο ή επικρατούν χαρακτήρα (36-38). Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ποικίλη διεισδυτικότητα των μεταλλάξεων του TACI, αιτιολογώντας το γεγονός ότι άτομα που φέρουν τις μεταλλάξεις του TACI δεν εκδηλώνουν πάντα αντισωματικές ανεπάρκειες.

1.7 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ TACI ΣΤΙΣ ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ

Γενετικές παραλλαγές του *TNFRSF13B* παρατηρούνται στο 10-20% περίπου των ασθενών με CVID και sIgAD (36-38) και η εμφάνισή τους φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένη επίπτωση σπληνομεγαλίας και αυτοανοσίας στους ασθενείς αυτούς (39). Οι μεταλλάξεις C104R και A181E είναι οι συχνότερες και φαίνεται πως διαδραματίζουν σημαντικότερο ρόλο στην CVID. Ειδικά η μετάλλαξη C104R, που εντοπίζεται στην CRD2 περιοχή, διαπιστώθηκε ότι παρεμποδίζει την πρόσδεση του συνδέτη (ακόμη και σε ετερόζυγη μορφή) (40). Ωστόσο μικρό ποσοστό υγιών εμφανίζει σε ετεροζυγωτία τις μεταλλάξεις C104R και A181E χωρίς αντισωματική ανεπάρκεια (35). Παρά το γεγονός ότι αυτή η μερίδα του πληθυσμού δεν εκδηλώνει CVID, *in vitro* μελέτες αναδεικνύουν χαμηλότερη έκφραση του TACI στα B κύτταρά τους, σε σχέση με τον υπόλοιπο πληθυσμό (35).

Ωστόσο η μείωση της έκφρασης του TACI δεν έχει πάντοτε αρνητική επίδραση στην ανοσιακή απάντηση. Ενδέχεται οι μεταλλάξεις του TACI στο γενικό πληθυσμό να αποτελούν μηχανισμό προσαρμογής στο περιβάλλον. Τα ελλείματα στην έκφραση του TACI και τη λειτουργία του μπορεί να επιτρέπουν στον ανθρώπινο πληθυσμό να παράγει ταχύτατα υψηλής συγγένειας IgG αντισώματα για την καταπολέμηση παθογόνων. Παρ' όλα αυτά οι μεταλλάξεις του TACI αυξάνουν τον κίνδυνο για εκδήλωση CVID (4, 35).

Οι μεταλλάξεις του TACI στη CVID σχετίζονται με αυξημένη ευαισθησία σε αυτοανοσία. Ο TACI ρυθμίζει την λειτουργία του BCR, TLR7 και TLR9, οι οποίοι εμπλέκονται στην αναγνώριση των αυτοαντισωμάτων και την κεντρική ανοχή. Οπότε οι μεταλλάξεις του TACI επηρεάζουν αρνητικά τον μηχανισμό της κεντρικής ανοχής, με αποτέλεσμα την αδυναμία απομάκρυνσης αυτοδραστικών B κυττάρων. Σε υγιείς που εμφανίζουν μεταλλάξεις του TACI, ο φυσιολογικός μηχανισμός της περιφερικής ανοχής υποκαθιστά τα ελλείματα της κεντρικής ανοχής, προφυλάσσοντας τα άτομα από αυτοάνοσες αντιδράσεις. Από την άλλη πλευρά, στους ασθενείς με CVID που εμφανίζουν μεταλλάξεις του γονιδίου TACI, οι μηχανισμοί της περιφερικής ανοχής δεν είναι ικανοί να αναπληρώσουν ελλείματα της κεντρικής ανοχής, κάνοντας τους έτσι επιρρεπείς σε αυτοάνοσες διαταραχές (41).

1.8 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ TACI ΣΕ ΑΛΛΕΣ ΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΟΝΤΟΤΗΤΕΣ

Η πρόσδεση των συνδετών BAFF και APRIL στους υποδοχείς των καρκινικών B κυττάρων έχειδειχθεί ότι μπορεί να αναστείλλει την απόπτωση και να προωθήσει την κυτταρική επιβίωση *in vitro* (42, 43). Οι κυτταροκίνες BAFF και APRIL ενεργοποιούν στα κύτταρα της CLL τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ μέσω του κλασικού μονοπατιού όταν προσδένονται στους υποδοχείς TACI και BCMA, ενώ η κυτταροκίνη BAFF ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ μέσω του εναλλακτικού μονοπατιού όταν προσδένεται στον υποδοχέα BAFFR (44). Η αυτοκρινής, αλλά και παρακρινής δράση των συνδετών στους υποδοχείς τους έχει ενοχοποιηθεί για την προστασία των CLL κυττάρων από την απόπτωση (43). Επιπλέον οι ασθενείς με χαμηλότερα επίπεδα ενδοκυττάριας έκφρασης BAFF και APRIL έχουν μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής, αποδίδοντας έτσι προγνωστική αξία στους δύο συνδέτες (45). Τα επίπεδα APRIL στον ορό είναι ιδιαίτερα υψηλά ενώ του BAFF πολύ χαμηλά έως μη ανιχνεύσιμα (46). Επιπλέον η έκφραση του TACI στα CLL κύτταρα είναι χαμηλή (6).

Ο TACI εκφράζεται σε πολλούς τύπους λεμφωμάτων όπως το πολλαπλούν μυέλωμα, τα Hodgkin λεμφώματα και τα non-Hodgkin (47-49). Στους ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα που εμφανίζουν χαμηλή έκφραση του TACI, παρατηρείται φτωχότερη πρόγνωση (50). Στα Hodgkin λεμφώματα που δεν εκφράζεται ο BAFFR, φαίνεται πως ο TACI και ο BCMA προωθούν την ανάπτυξη των νεοπλασματικών κυττάρων (47). Σε αντίθεση, τα non-Hodgkin λεμφώματα όχι μόνο εκφράζουν BAFFR, TACI και /ή BCMA, αλλά επίσης και BAFF και APRIL, οι οποίοι ενισχύουν έναν αυτοκρινή μηχανισμό για την επιβίωση (49). Ο APRIL και ο BAFF προωθούν την ανάπτυξη των νεοπλασματικών κυττάρων χωρίς να είναι ξεκάθαρο αν αυτό επιτυγχάνεται δια μέσου του BCMA ή του TACI. Η εξουδετέρωση του BAFF και/ή του APRIL μειώνει την επιβίωση των νεοπλασματικών κυττάρων, προσφέροντας μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική στην θεραπεία των λεμφωμάτων (5).

Οι διαταραχές στη σηματοδότηση του TACI μπορεί να συνδέονται με αυτοάνοσες διαταραχές. Ποντίκια που δεν εκφράζουν TACI εμφανίζουν λεμφοϋπερπλασία, νεφρίτιδα δίκην SLE και αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούντων αυτοαντισωμάτων (27, 51). Στα πλαίσια διερεύνησης λεμφοϋπερπλαστικών νόσων, η συχνότητα μεταλλάξεων του *TNFRSF13B/TACI* σε ασθενείς με υπερτροφία των αμυγδαλών ήταν υψηλότερη από εκείνη του γενικού πληθυσμού (52). Τα επίπεδα της διαλυτής μορφής του TACI είναι αυξημένα στο SLE, αν και η δράση της δεν είναι πλήρως ξεκάθαρη. Δεδομένου πως τα επίπεδα του BAFF στο πλάσμα είναι αυξημένα σε ασθενείς με SLE, CLL και CVID, τα αυξημένα επίπεδα της διαλυτής μορφής του TACI μπορεί να σχετίζονται με

μηχανισμούς ανατροφοδότησης μέσω των οποίων ρυθμίζονται τα επίπεδα του BAFF (4, 53, 54). Επιπλέον το μονοκλωνικό αντίσωμα belimumab, ένας ειδικός αναστολέας του BAFF εγκρίθηκε το 2011 από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφών και Φαρμάκων (FDA) για τη θεραπεία του SLE (9, 55).

2. ΧΡΟΝΙΑ ΡΙΝΟΚΟΛΠΙΤΙΔΑ (CRS)

Η ρινοκολπίτιδα ορίζεται ως η συμπτωματική φλεγμονή των παραρρινίων κόλπων και της ρινικής κοιλότητας. Ο όρος ρινοκολπίτιδα προτιμάται της παραρρινοκολπίτιδας λόγω του γεγονότος πως η φλεγμονή των παραρρινίων κόλπων συνοδεύεται από φλεγμονή του βλεννογόνου της ρινικής κοιλότητας (56). Η CRS (με ή χωρίς ρινικούς πολύποδες) στους ενήλικους ορίζεται από την παρουσία δύο ή περισσότερων συμπτωμάτων ένα από τα οποία πρέπει να είναι είτε η ρινική απόφραξη/ συμφόρηση ή η ρινική καταρροή (πρόσθια ή οπίσθια):

- \pm άλγος ή πίεση στο πρόσωπο
- \pm μείωση ή απώλεια της όσφρησης

για ≥ 12 εβδομάδες (1).

Ο στόχος στη θεραπεία της CRS είναι η επίτευξη ελέγχου της νόσου κλινικά. Ως έλεγχος νόσου ορίζεται η κατάσταση εκείνη κατά την οποία ο ασθενής δεν εμφανίζει συμπτώματα ή τα συμπτώματα δεν είναι ενοχλητικά, και αν είναι δυνατόν συνδυάζεται με υγιή ή σχεδόν υγιή βλεννογόνο που έχει ανάγκη μόνο τοπικής θεραπείας (Πίνακας 1) (1).

Πίνακας 1: Έλεγχος νόσου σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Θέση για τις Ρινοκολπίτιδες (EPOS, European Position of Sinusitis) (1).

Χαρακτηριστικά	Υπό πλήρη έλεγχο (όλα τα παρακάτω)	Υπό μερικό έλεγχο (τουλάχιστον ένα από τα παρακάτω)	Χωρίς έλεγχο
Ρινική απόφραξη	Απουσία ή χωρίς να προκαλεί ενοχλήσεις	Παρούσα τις περισσότερες μέρες της εβδομάδας	3 ή περισσότερα χαρακτηριστικά της μερικώς ελεγχόμενης CRS
Ρινόρροια/ οπισθορινική καταρροή	Βλεννώδης, μικρής ποσότητας	Βλεννοπυώδης τις περισσότερες ημέρες της εβδομάδας	
Πόνος στο πρόσωπο/ κεφαλαλγία	Απών ή χωρίς να προκαλεί ενοχλήσεις	Παρών	
Όσφρηση	Φυσιολογική ή ελαφρώς μειωμένη	Μειωμένη	
Διαταραχές στον ύπνο ή κόπωση	Μη υπαρκτές	Υπαρκτές	
Ενδοσκόπηση ρινός (αν είναι διαθέσιμη)	Υγιής ή σχεδόν υγιής βλεννογόνος	Πάσχων βλεννογόνος (ρινικοί πολύποδες, βλεννοπυώδεις εκκρίσεις)	
Συστηματική αγωγή	Μη αναγκαία	Ένας κύκλος αντιβιοτικών ή συστηματικών κορτικοστεροειδών τους τελευταίους 3 μήνες	Μεγάλης διάρκειας χορήγηση αντιβιοτικών ή συστηματικών κορτικοστεροειδών τον τελευταίο μήνα

Το πραγματικό ποσοστό των ασθενών με CRS στους οποίους επιτυγχάνεται έλεγχος νόσου δε μπορεί να υπολογιστεί με ακρίβεια καθώς είναι αναγκαία η διενέργεια περισσότερων μελετών.

Παρά το γεγονός ότι στους περισσότερους ασθενείς με CRS θα επιτευχθεί έλεγχος της νόσου, ωστόσο σε ένα ποσοστό αυτό δεν είναι δυνατό. Οι ασθενείς, οι οποίοι δε θα εμφανίσουν ένα αποδεκτό επίπεδο ελέγχου νόσου παρά το γεγονός ότι θα έχουν υποβληθεί στο κατάλληλο χειρουργείο, θα έχουν λάβει τοπική (ενδορρινική) θεραπεία με κορτικοστεροειδή και θα έχουν λάβει τουλάχιστον δύο βραχείς κύκλους αντιβιοτικών ή συστηματικών κορτικοστεροειδών τον τελευταίο χρόνο, θεωρείται ότι εμφανίζουν ανθεκτική στη θεραπεία CRS (1).

2.1 ΥΠΟΤΥΠΟΙ ΤΗΣ CRS

Η χρόνια ρινοκολπίτιδα (CRS, Chronic RhinoSinusitis) προσβάλλει περίπου το 5-15% του γενικού πληθυσμού στην Ευρώπη και την Αμερική (57). Αποτελεί μία ετερογενή ασθένεια με πολλαπλούς αιτιολογικούς παράγοντες και ποικίλλους παθογενετικούς μηχανισμούς. Οι δύο βασικοί υπότυποι της είναι με ρινικούς πολύποδες (CRSwNP, Chronic Rhinosinusitis with nasal polyps) και χωρίς ρινικούς πολύποδες (CRSsNP, Chronic Rhinosinusitis without nasal polyps). Ο διαχωρισμός των παραπάνω υποτύπων είναι κλινικός, αφού βασίζεται στο φαινότυπο της νόσου, παρά στην παθογένεια, την ιστοπαθολογία ή σε βιοδείκτες (57).

Επιπλέον οι χρόνιες ρινοκολπίτιδες διαχωρίζονται με βάση την ιστοπαθολογική εικόνα σε ηωσινοφιλική (E CRS) και μη ηωσινοφιλική χρόνια ρινοκολπίτιδα (non-E CRS). Φαίνεται πως η E CRS σχετίζεται με συμπτωματολογία μεγαλύτερης βαρύτητας, χειρότερη όσφρηση, αυξημένη συν-νοσηρότητα με άσθμα και εν γένει φτωχότερα αποτελέσματα (58-60).

2.2 ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ CRS

Η αιτιοπαθογένεια της CRS δεν είναι πλήρως γνωστή. Πολλές θεωρίες έχουν προταθεί στο πέρασ των ετών, χωρίς όμως καμία από αυτές να είναι ικανή να αιτιολογήσει πλήρως την κλινική εικόνα της νόσου. Ιστορικά η CRSwNP θεωρούνταν μια μη φλεγμονώδης διαταραχή που σχετιζόταν με την ατοπία. Έρευνες των τελευταίων ετών αποδεικνύουν πως η αιτιολογία και η παθογένεια είναι πολύ πιο περίπλοκες και αλληλοκαλυπτόμενες, βασιζόμενες ουσιαστικά σε μια δυσλειτουργική αλληλεπίδραση ανάμεσα στα χαρακτηριστικά του ξενιστή και περιβαλλοντικούς

παράγοντες, που υποκινεί και διαιωνίζει τη φλεγμονώδη αντίδραση που χαρακτηρίζει τη CRS (61). Οι ενδογενείς και οι εξωγενείς αιτιολογικοί παράγοντες που συμμετέχουν στην εμφάνιση CRS φαίνονται στους Πίνακες 2 και 3 αντίστοιχα.

Πίνακας 2: Ενδογενείς αιτιολογικοί παράγοντες της CRS (από Benninger και συν.) (62).

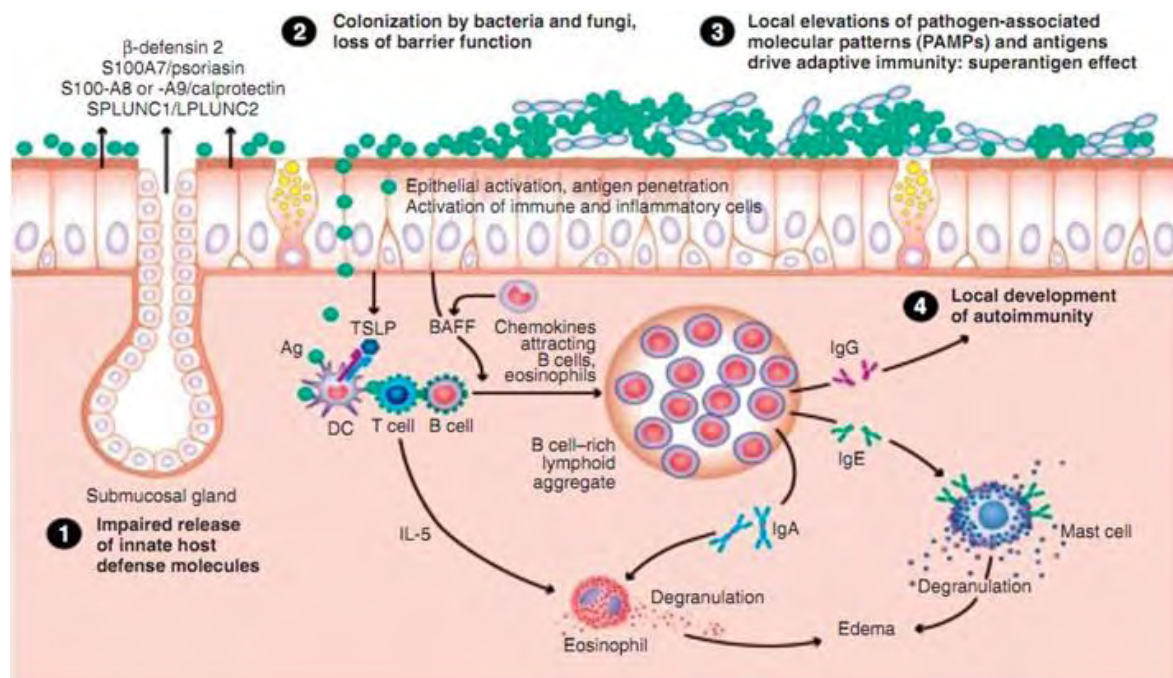
1. Γενετικοί <ul style="list-style-type: none">• Διαταραχές του επιθηλίου<ul style="list-style-type: none">a) Κυστική ίνωσηb) Πρωτοπαθής δυσκινησία των κροσσών• Δομικοί• Ανοσοανεπάρκεια
2. Επίκτητοι <ul style="list-style-type: none">• Υπερευαισθησία στην ασπιρίνη που σχετίζεται με άσθμα και ρινικούς πολύποδες• Ορμονικοί<ul style="list-style-type: none">a) Ρινίτιδα της κύησηςb) Υποθυρεοειδισμός• Δομικοί<ul style="list-style-type: none">a) Νεοπλάσματαb) Οστεονεογένεσηc) Κύστεις εκ κατακρατήσεως και χοανοπολύποδες
3. Αυτοάνοσοι ή ιδιοπαθείς <ul style="list-style-type: none">• Κοκκιωματώδεις νόσοι<ul style="list-style-type: none">a) Σαρκοείδωσηb) Κοκκιωμάτωση Wegener• Αγγειΐτιδες<ul style="list-style-type: none">a) Συστηματικός ερυθηματώδης λύκοςb) Σύνδρομο Churg- Straus• Περφυγοειδή
4. Ανοσοανεπάρκεια

Πίνακας 3: Εξωγενείς αιτιολογικοί παράγοντες της CRS (από Benninger και συν.) (62).

1. Φλεγμονώδεις (ιοί, βακτήρια, μήκυτες, παράσιτα)
2. Μη φλεγμονώδεις <ul style="list-style-type: none">• Αλλεργικοί• Υπερευαίσθησιες• Φαρμακολογικοί• Ερεθιστικοί
3. Διαταραχή του φυσιολογικού αερισμού και της παροχέτευσης της βλέννης <ul style="list-style-type: none">• Χειρουργείο• Φλεγμονή• Τραυματισμός

2.3 ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ CRSwNP

Κατά την προσπάθεια αιτιολόγησης του σχηματισμού πολυπόδων στη CRSwNP διάφορες θεωρίες έχουν προταθεί. Η θεωρία της επίδρασης των μηκύτων, είναι η πρώτη θεωρία που προσπάθησε να αιτιολογήσει τους μηχανισμούς ανάπτυξης της CRS, η οποία αναφέρει πως η CRS αποτελεί συνέπεια μιας υπερβολικής αντίδρασης του ξενιστή στο μύκητα *Alternaria* (63). Διαταραχές στο μονοπάτι του εικοσανοειδούς προτάθηκαν επίσης, σαν πιθανή αιτιολογία της CRSwNP. Συγκεκριμένα, η αυξημένη σύνθεση προφλεγμονωδών λευκοτριενίων και η ελαττωμένη σύνθεση αντιφλεγμονωδών προσταγλανδινών (PGE2) παρουσιάζονται ως ο μηχανισμός ανάπτυξης CRSwNP (64, 65). Η θεωρία του σταφυλοκοκκικού υπεραντιγόνου που έχει προταθεί, προτείνει πως οι εξωτοξίνες προκαλούν το σχηματισμό ρινικών πολυπόδων διαμέσου της επίδρασης σε έναν αριθμό κυττάρων (66). Η Th2 αντίδραση, η αναστολή των Tregs και η αυξημένη τοπική δραστηριότητα των ηωσινοφίλων και των μαστοκυττάρων οδηγούν σε ιστική βλάβη και αναδιαμόρφωση. Ακόμη μία θεωρία που έχει προταθεί είναι αυτή των βιομεμβρανών, χωρίς όμως να είναι απολύτως ξεκάθαρη η δράση τους επί των ιστών. Η θεωρία του ανοσιακού φραγμού υποστηρίζει πως διαταραχές του μηχανικού φραγμού του ρινικού επιθηλίου και/ή της φυσικής ανοσίας οδηγούν σε αυξημένο μικροβιακό αποικισμό με πολλαπλούς μικροβιακούς παράγοντες, με αποτέλεσμα διαταραχές στην επίκτητη ανοσία (Εικόνα 6) (1).



Εικόνα 6: Η θεωρία του ανοσιακού φραγμού.

1. Διαταραχές του ρινικού επιθηλίου του ξενιστή έχουν ως αποτέλεσμα μειωμένη παραγωγή αντιμικροβιακών παραγόντων της φυσικής ανοσίας.
2. Τοπικές διαταραχές της ανοσιακής απάντησης επιτρέπουν τον αποικισμό και την υπερανάπτυξη μικροβιακών παραγόντων.
3. Η ακεραιότητα του επιθηλιακού φραγμού διαταράσσεται δευτερογενώς από την επιθηλιακή ενεργοποίηση επιτρέποντας την αύξηση της άμεσης διέγερσης των T και B-κυττάρων μέσω διαμεσολαβούμενου αντιγόνου.
4. Οι προφλεγμονώδεις παράγοντες οδηγούν σε δυσλειτουργία του τοπικού φλεγμονώδους μικροπεριβάλλοντος που οδηγεί σε τοπικό σχηματισμό εκκριτικού επιθηλίου και παραγωγή ανοσοσφαιρίνης. Τοπικά αντισώματα διαμεσολαβούν στην αποκοκκίωση των ηωσινόφιλων και βασεόφιλων, απελευθερώνοντας κυτταροτοξικούς και αγγειοδιασταλτικούς παράγοντες στο ρινικό βλεννογόνο (από EPOS 2012) (1).

Τα τελευταία χρόνια η έρευνα για την αιτιοπαθογένεια της CRSwNP έχει στραφεί σε κυτταρικό επίπεδο. Σε ασθενείς με CRSwNP, στους ρινικούς πολύποδες παρατηρούνται αυξημένες τιμές IgA, IgE και IgG σε σχέση με ασθενείς με CRSsNP και ομάδες ελέγχου, πιθανότατα σε απάντηση σε αντιγόνα βακτηρίων και μυκήτων (67-69). Τα αυξημένα επίπεδα στους ρινικούς πολύποδες δε συνοδεύονται από ανάλογη αύξηση στον ορό, υποδεικνύοντας πως σημαντική σύνθεση ανοσοσφαιρινών πραγματοποιείται τοπικά στο ρινικό βλεννογόνο (70). Επιπλέον, υψηλά επίπεδα

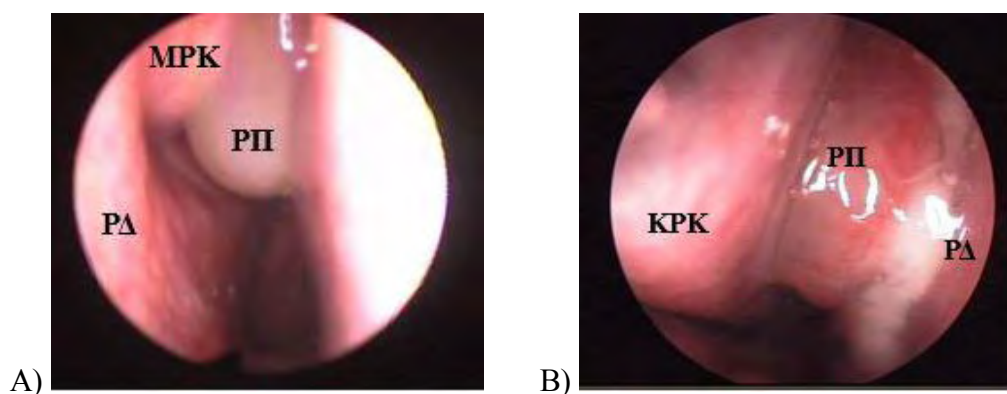
B κυττάρων και πλασματοκυττάρων αναγνωρίζονται σε ρινικούς πολύποδες σε σχέση με ασθενείς με CRSsNP και ομάδες ελέγχου (67, 69). Ακόμη, υψηλά επίπεδα BAFF αναγνωρίζονται σε ρινικούς πολύποδες και τα επίπεδά του σχετίζονται με τον αριθμό των B κυττάρων στους ρινικούς πολύποδες (67).

Οι Tan et al. αναγνώρισαν τοπικά αυξημένα επίπεδα IgA και IgG αντιπυρηνικά αυτοαντισώματα, σε απουσία συστηματικής αυτοανοσίας σε ασθενείς με CRSwNP. Τα επίπεδα αυτών των αυτοαντισωμάτων ήταν υψηλότερα σε ασθενείς με μικρότερο έλεγχο νόσου, που είχαν υποβληθεί σε πολλαπλές χειρουργικές επεμβάσεις, υποδεικνύοντας μια συνιστώσα αυτοανοσίας στις σοβαρότερες μορφές της CRSwNP (71).

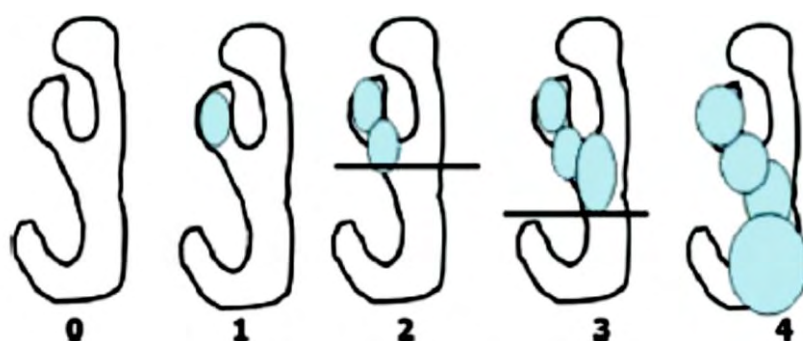
2.4 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ- ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Η συμπτωματολογία των ασθενών με CRSwNP συνίσταται στην εμφάνιση ρινικής απόφραξης ή συμφόρησης, ρινικής καταρροής, προσωπαλγίας ή αίσθημα βάρους στο πρόσωπο, κεφαλαλγίας, υποσμίας, βήχα κα. Η δυσχέρεια της ρινικής αναπνοής που προκαλείται δύναται να οδηγήσει σε διαταραχές στον ύπνο (σύνδρομο υπνικής άπνοιας), κόπωση, υπνηλία με σημαντικές επιπτώσεις στην καθημερινότητα των ασθενών.

Η μέθοδος εκλογής για τη διάγνωση της CRSwNP είναι η ενδοσκόπηση, διαμέσου της οποίας αναγνωρίζονται οι πολυποειδείς μάζες και ταξινομείται η νόσος (Εικόνα 7). Μία από τις συνηθέστερες ταξινομήσεις που χρησιμοποιούνται είναι η ταξινόμηση κατά Meltzer (Εικόνα 8) (72).



Εικόνα 7: Ενδοσκοπικές εικόνες ρινικών πολυπόδων. Α) στάδιο 2 κατά Meltzer, Β) στάδιο 3 κατά Meltzer. KPK: κάτω ρινική κόγχη, MPK: μέση ρινική κόγχη, ΡΔ: ρινικό διάφραγμα, ΡΠ: ρινικοί πολύποδες (από προσωπικό αρχείο Γ.Τσιούμα)



Εικόνα 8: Σύστημα ταξινόμησης πολυπόδων κατά Meltzer: 0= χωρίς ευρήματα πολυπόδων, 1= μικρές μάζες πολυπόδων στο μέσο ρινικό πόρο, 2= πολλαπλοί πολύποδες στο μέσο ρινικό πόρο, 3= πολύποδες που εκτείνονται εκτός του μέσου ρινικού πόρου και του σφηνοηθμοειδούς κολώματος αλλά δεν αποφράσσουν πλήρως τη ρινική θάλαμη, 4= πολύποδες που αποφράσσουν πλήρως τη ρινική θάλαμη (από Meltzer και συν.) (72).

2.5 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ CRSwNP

Η θεραπευτική προσέγγιση της CRS περιλαμβάνει ενδορρινικά κορτικοστεροειδή, μικρής διάρκειας θεραπείες με από του στόματος κορτικοστεροειδή, και ρινοπλύσεις με φυσιολογικό ορό. Τα αντιβιοτικά, τα αντιλευκοτριένια και τα τοπικά αποσυμφορητικά χρησιμοποιούνται επίσης, με χαμηλότερου βαθμού ένδειξη. Έλεγχος νόσου με τις παραπάνω αγωγές επιτυγχάνεται περίπου στο 38-51% των ασθενών (73, 74). Όταν η φαρμακευτική αγωγή αποτυγχάνει να ελέγξει τη νόσο, οι ασθενείς δύναται να αντιμετωπιστούν χειρουργικά, αλλά η φαρμακευτική αγωγή συνεχίζει να κατέχει σημαντικό ρόλο μετεγχειρητικά (75, 76).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω δεδομένα, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση μεταλλάξεων του *TNFRSF13B/TACI* σε ασθενείς με CRSwNP, και η πιθανή συσχέτιση αυτών με την αιτιοπαθογένεια, το φαινότυπο και την πορεία αυτών των ασθενών.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ

Στην παρούσα μελέτη εντάχθηκαν 44 ασθενείς (άνδρες/γυναίκες: 33/11) με CRSwNP. Ο μέσος όρος ηλικίας ήταν 52,5 έτη, με εύρος ηλικίας 16- 83 έτη. Η πλειοψηφία των ασθενών παρακολουθούνταν στην ΩΡΛ Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας ή στην ΩΡΛ Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Βόλου «Αχιλλοπούλειο». Εννιά δείγματα ασθενών προήλθαν από το αρχείο του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τα δείγματα του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας αφορούσαν ιστούς ρινικών πολυπόδων ενώ τα δείγματα από τα Νοσοκομεία Λάρισας και Βόλου αφορούσαν περιφερικό αίμα (PBL). Όλοι οι ασθενείς που εντάχθηκαν στη μελέτη έπασχαν από χρόνια ρινοκολπίτιδα σύμφωνα με τα κριτήρια EPOS 2012 (European Position of Sinusitis 2012) και εμφάνιζαν κατά την ενδοσκόπηση ρινικούς πολύποδες αμφοτερόπλευρα.

Κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη ήταν το ιστορικό κακοήθειας ρινός- παραρρίνιων κόλπων, το ιστορικό ακτινοβολίας κεφαλής και τραχήλου, το ιστορικό χημειοθεραπείας, η μονόπλευρη πολυποδίαση.

Από τους ασθενείς που μελετήθηκαν 16 εμφάνιζαν κάποια αλλεργία, 9 αλλεργικό βρογχικό άσθμα και 2 εμφάνιζαν τριάδα Samter (CRSwNP, αλλεργικό βρογχικό άσθμα και υπερευαισθησία στην ασπιρίνη ή σε ΜΣΑΦ).

Επιπλέον 5 από τους ασθενείς εμφάνιζαν ανθεκτική στη θεραπεία CRSwNP, σταδίου 4 κατά Meltzer και είχαν υποβληθεί σε πολλαπλά χειρουργεία (n=3-6) χωρίς να επιτευχθεί έλεγχος νόσου. Από αυτούς, ένας ασθενής ανέφερε IgE μυελίτιδα στο ιστορικό του και άλλος ένας κυστική ίνωση.

Μία ομάδα 259 υγιών μαρτύρων χωρίς ιστορικό υποτροπιάζουσων λοιμώξεων ή αυτοάνοσων παθήσεων (άνδρες/γυναίκες: 162/97, μέση ηλικία 69,2 έτη, ηλικιακό εύρος 19-86 έτη) χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα ελέγχου για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων των ασθενών με CRSwNP με τον ελληνικό γενικό πληθυσμό. Τα δείγματα προήλθαν από τη βάση δεδομένων του Εργαστηρίου Ανοσολογίας- Ιστοσυμβατότητας. Τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών και των υγιών μαρτύρων φαίνονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Δημογραφικά στοιχεία ασθενών και υγιών μαρτύρων

	CRSwNP	Μάρτυρες
Αριθμός	44	259
Άνδρες/ Γυναίκες	33/ 11	162/97
Μ.Ο. ηλικίας/ Εύρος ηλικίας	52,45/ 16-83	69,2/ 19-86

Η έρευνα διεξήχθη σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι, που συντάχθηκε από την Παγκόσμια Ιατρική Ένωση (WMA). Σέ όλα τα άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη έγινε σχετική ενημέρωση και παραλήφθηκε ενυπόγραφη συγκατάθεση.

2. ΥΛΙΚΑ

2.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ

Στο σύνολο των διεργασιών που συμπεριλαμβάνονται στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια και αναλώσιμα υλικά, τα χαρακτηριστικά των οποίων αναγράφονται στους Πίνακες 5 και 6, αντίστοιχα.

Πίνακας 5: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και τα χαρακτηριστικά τους

Αντιδραστήρια	Όνομα προϊόντος	Αρ. Καταλόγου	Προέλευση
Ισοπροπανόλη	Isopropanol	AL0323	Scharlau, Spain
Αιθανόλη 100%	Absolute Ethanol	ET0016	Scharlau, Spain
Αποστειρωμένο νερό	Water for injection		DEMO S.A, Greece
Αγαρόζη	Agarose low EEO (Agarose Standard)	A2114,0500	Applichem, USA
Βρωμιούχο αιθίδιο	Ethidium Bromide, 10mg/ml	15585-011	Biorad, USA
Διάλυμα ρυθμιστικό χωρίς MgCl ₂	PCR Run Buffer 10x (-MgCl ₂)		BIORON, Germany
Διάλυμα ρυθμιστικό με MgCl ₂	100Mm MgCl ₂	P041311-M	BIORON, Germany
Διάλυμα TBE	10x TBE BUFFER ULTRAPURE	15581-044	Gibco, UK
Μάρτυρας DNA	100bp DNA Ladder	15628-019	Invitrogen, USA
Ολιγονουκλεοτίδια	100mM dATP 100mM dCTP 100mM dGTP 100mM Dttp	P/N 55082 P/N 55083 P/N 55084 P/N 55084	Invitrogen, UK
Πολυμεράση Taq	DFS-Taq DNA polymerase	101005	BIORON, Germany
Χρωστική	Formaldehyde Load Dye	8550G	Ambion, UK
Kit εκχύλισης DNA	PureLink® Genomic DNA Kit	K1820-01	Invitrogen, UK
Kit καθαρισμού προϊόντος PCR	PureLink® PCR Purification Kit	K3100-01	Invitrogen, UK
Kit εξαγωγής υλικού από γέλη	PureLink Quick® Gel Extraction Kit	K2100-12	Invitrogen, UK

Πίνακας 6: Αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και τα χαρακτηριστικά τους

Αναλώσιμα	Όνομα προϊόντος	Αρ. Καταλόγου	Προέλευση
Βαθμονομημένη πιπέτα 0,2-2 µL	0,2-2µL pipette, sterile	F144801	Gilson Inc,USA
Βαθμονομημένη πιπέτα 1-10 µL	1-10µL pipette, sterile	F144802	Gilson Inc,USA
Βαθμονομημένη πιπέτα 2-20 µL	2-20µL pipette, sterile	F123600	Gilson Inc,USA
Βαθμονομημένη πιπέτα 20-100 µL	20-100µL pipette, sterile	F123615	Gilson Inc,USA
Βαθμονομημένη πιπέτα 50-200 µL	50-200µL pipette, sterile	F123601	Gilson Inc,USA
Βαθμονομημένη πιπέτα 200-1000 µL	200-1000µL pipette, sterile	F123602	Gilson Inc,USA
Ρύγχοι πιπέτας 10µL	10µL sterilized long tips	DL10ST	Gilson Inc,USA
Ρύγχοι πιπέτας 100µL, με φίλτρο	100µL sterilized filter tips	DF100ST	Gilson Inc,USA
Ρύγχοι πιπέτας 1000µL	1000µL sterilized filter tips	DF1000ST	Gilson Inc,USA
Ρύγχοι πιπέτας 200µL	200µL sterilized tips	D200ST	Gilson Inc,USA
Ρύγχοι πιπέτας 200µL, με φίλτρο	200µL sterilized filter tips	DF200ST	Gilson Inc,USA
Ρύγχοι πιπέτας 30µL, με φίλτρο	30µL sterilized filter tips	DF30ST	Gilson Inc,USA
Σωληνάρια γενικής αίματος	S-Monovette® Haematology EDTA K ₃ tubes	04.1917	SARSTEDT, GERMANY

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκαν ειδικά συστήματα των QiAamp DNA Blood Mini Kit και PureLink® Genomic DNA Kit (Qiagen & Invitrogen) για την επιλεκτική δέσμευση του DNA σε μεμβράνη με βάση το πυρίτιο, παρουσία χαοτροπικών αλάτων. Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που προτείνεται από τον κατασκευαστή του παρασκευάσματος, για την απομόνωση γενετικού υλικού από εμπύρνηνα λευκοκύτταρα και τον καθαρισμό του από προσμίξεις (πρωτεΐνες, RNA) και ενζυμικούς αναστολείς. Παρακάτω περιγράφεται αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε με βάση το PureLink® Genomic DNA Kit. Το σύστημα απομόνωσης περιλάμβανε 4 τύπους διαλυμάτων, η σύσταση των οποίων δεν αναφέρεται από την εταιρία. Σε σωληνάριο φυγοκέντρωσης των 1.5 mL μεταφέρθηκαν 200 µL από κάθε φιαλίδιο γενικής περιφερικού αίματος με αντιπηκτικό K3EDTA. Μετά από προσθήκη 20 µL πρωτεϊνάσης K, για τη διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών στις καρβοξυτελικές θέσεις αλειφατικών, αρωματικών και υδρόφοβων αμινοξέων, και 20 µL RNAάσης για την απομάκρυνση του RNA που υπάρχει στο δείγμα, ακολούθησε ανάδευση και επώαση για 2 min. Κατόπιν, προστέθηκαν 200 µL διαλύματος λύσης (PureLink® Genomic Lysis/ Binding Buffer) που ενισχύει τη δραστηριότητα της πρωτεϊνάσης K, στοχεύοντας έτσι, στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών και κατεπέκταση την αποτελεσματική λύση των κυττάρων, και ακολούθησε ανάδευση και επώαση στους 55 °C για 10 min. Έπειτα προστέθηκαν 200 µL αιθανόλης 96-100% που σε συνδυασμό με το διάλυμα λύσης επιτρέπει υψηλό βαθμό πρόσδεσης του DNA στη στήλη, και ακολούθησε μεταφορά του μείγματος σε ειδική στήλη (PureLink® Spin Column). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στις 10.000 στροφές για 1 min και ακολούθησαν δύο διαδοχικές πλύσεις της στήλης, με προσθήκη 500 µL από τα διαλύματα Wash Buffer 1 και Wash Buffer 2 και φυγοκέντρωση στις 10.000 στροφές για 1 min και στις 14.000 στροφές για 3 min, αντίστοιχα, προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν προσμίξεις (πρωτεΐνες, RNA) και ενζυμικοί αναστολείς. Στο τελευταίο στάδιο, η στήλη μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο φυγοκέντρωσης των 1,5 mL όπου και προστέθηκαν 100 µL διαλύματος έκλουσης (PureLink Genomic Elution Buffer) σε αυτή, και μετά από επώαση 1 min, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στις 14.000 στροφές για 1 min. Η τελική συγκέντρωση του DNA ανερχόταν περίπου στα 50-200 ng/µL. Τα δείγματα DNA διατηρούνται στους 2-8°C για λίγες μέρες ή κατά προτίμηση στους -20°C για μεγάλο χρονικό διάστημα, όπως στην δική μας περίπτωση.

3.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

3.2.1 PCR ΓΙΑ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ TNFRSF13B/TACI

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας εφαρμόστηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, με εκκινητές προερχόμενους από τη διεθνή βιβλιογραφία, με σκοπό την ενίσχυση των 5 εξονίων του γονιδίου TACI. Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται αναλυτικά η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων και το μήκος των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και το μέγεθος του γονιδιακού προϊόντος που ενισχύεται.

Πίνακας 7: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των 5 εξονίων του γονιδίου *TNFRSF13B/TACI*

Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')		Μήκος (bp)	Μήκος (bp) προϊόντος pcr
Εξόνιο 1	5'-GGGTGTGGCTGATTTACATCC-3'	21	340
	5'-CCAGAGGCATCCAGACTCG-3'	19	
Εξόνιο 2	5'-AAAGGTTGTCTGTGCGAATGT-3'	21	319
	5'-CCAGAGGGTGCTCTAGGGAG-3'	20	
Εξόνιο 3	5'-ATCAAAATGCAATGCAGCTAAA-3'	22	635
	5'-AGACTTCTGGAAATGTTGCCTA-3'	22	
Εξόνιο 4	5'-GGGGGAGTGGATCAAC-3'	16	540
	5'-GTCTGCCAGGATGTCTTAACC-3'	21	
Εξόνιο 5	5'-TGGCAGACAGATAACT-3'	16	717
	5'-CTCTCTCCTCATATCTCTC-3'	19	

Σε κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν 100–200 ng γενομικού DNA, 210 $\mu\text{mol/L}$ από κάθε τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο, 1.02 μmol από τον κάθε εκκινητή, 1.52 mmol/L MgCl_2 and 0.04 U/ μL του ενζύμου Taq πολυμεράση. Η PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 30 μL . Στον Πίνακα 8 παρατίθενται οι θερμοκρασίες, η διάρκεια του κάθε σταδίου καθώς και οι κύκλοι στους οποίους διεξήχθησαν οι συνθήκες της αντίδρασης. Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος θερμικός κυκλοποιητής Veriti 96 Well Thermacycler (Applied Biosystems) και ακολουθήθηκαν όλες οι προφυλάξεις για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων. Προκειμένου να ελεγχθεί η καθαρότητα των αντιδραστηρίων, σε κάθε πείραμα συμπεριλήφθηκε ένα

σωληνάριο ως μάρτυρας με dH₂O, αντί γενετικού υλικού. Τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2% και για την απεικόνισή τους εκτέθηκαν σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Πίνακας 8: Οι συνθήκες PCR για την ενίσχυση των 5 εξονίων του γονιδίου *TNFRSF13B/TACI*.

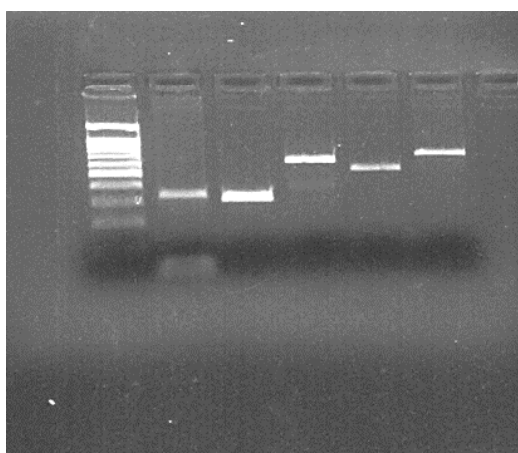
ΣΤΑΔΙΟ		ΕΞΟΝΙΟ				
		1	2	3	4	5
Αρχική αποδιάταξη (First denaturation)	Θερμοκρασία	94°C	94°C	94°C	94°C	96°C
	Διάρκεια	2 min	2 min	2 min	2 min	2 min
Αποδιάταξη (Denaturation)	Θερμοκρασία	94°C	94°C	94°C	94°C	96°C
	Διάρκεια	30 sec	30 sec	30 sec	30 sec	30 sec
Υβριδισμός (Annealing)	Θερμοκρασία	62°C	64°C	62°C	62°C	55°C
	Διάρκεια	30 sec	30 sec	30 sec	30 sec	30 sec
Επέκταση (Extension)	Θερμοκρασία	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C
	Διάρκεια	30 sec	30 sec	30 sec	30 sec	30 sec
Τελική επέκταση (Final extension)	Θερμοκρασία	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C
	Διάρκεια	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min
Κύκλοι		31	31	31	36	32

3.2.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΣΕ ΓΕΛΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Για τον έλεγχο του μεγέθους των προϊόντων της PCR καθώς και των καθαρισμένων προϊόντων πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης [2% (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X TBE]. Για τον εντοπισμό των ζωνών DNA στο πήκτωμα, προστέθηκε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου με τελική συγκέντρωση 0.5 ng/mL. Πρόκειται για μία φθορίζουσα χρωστική που έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται σε μόρια DNA και να φθορίζει, όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Σε κάθε δείγμα DNA προστίθεται διάλυμα χρωστικής (loading dye) σε αναλογία 1/6 του όγκου του δείγματος που ηλεκτροφορείται (5 μL δείγματος, 1 μL χρωστική) προκειμένου να

είναι διακριτή η μετανάστευσή τους στη γέλη. Κατόπιν, το κάθε μείγμα μεταφέρεται στις οπές της και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 120 V και 400 mA για 30 min. Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των προϊόντων PCR και των καθαρισμένων προϊόντων χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας μοριακών βαρών ο 100 bp DNA Ladder. Η φωτογράφιση της γέλης έγινε υπό υπεριώδες φως (UVITEC, SerialNo. M031308) και του συνοδού λογισμικού 'gel capture' (DNR Bioimaging Systems), ενώ οι φωτογραφίες αποθηκεύτηκαν σε μορφή bitmap. Στην Εικόνα 9 απεικονίζεται το αποτέλεσμα μιας αντιπροσωπευτικής ηλεκτροφόρησης pcr προϊόντων για τα 5 εξόνια του *TNFRSF13B/TACI*.



Εικόνα 9: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης των 5 εξονίων του γονιδίου *TNFRSF13B/TACI*. Κατά σειρά ladder, εξόνιο 1 (340bp), εξόνιο 2 (319bp), εξόνιο 3 (635bp), εξόνιο 4 (540bp) και εξόνιο 5 (717bp).

3.2.3 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΠΡΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΒΑΣΕΩΝ

Η παρουσία γενετικών ποικιλομόρφων στο γονίδιο *TNFRSF13B/TACI* ελέγχθηκε με ανάλυση αλληλουχίας βάσεων (sequencing) των δειγμάτων, μετά από καθαρισμό των προϊόντων PCR. Ο καθαρισμός των προϊόντων PCR έγινε με τη χρήση των Purelink PCR Purification Kit/QiAquick PCR Purification Kit και Purelink Quick Gel Extraction Kit/QiAquick Gel Extraction Kit (Qiagen/ Invitrogen). Το σύστημα απομόνωσης αποσκοπούσε στην απομάκρυνση εκκινητών, νουκλεοτιδίων, ενζύμων και αλάτων και βασίζεται στην επιλεκτική δέσμευση του δίκλωνου DNA σε μεμβράνη με βάση το πυρίτιο, παρουσία χαοτροπικών αλάτων. Ακολουθεί περιγραφή του πρωτοκόλλου των kit της Invitrogen. Η διαδικασία περιλαμβάνει την προσθήκη διαλύματος πρόσδεσης που περιέχει

ισοπροπανόλη (Binding Buffer, B2) σε κάθε φιαλίδιο με προϊόν PCR, σε όγκο τετραπλάσιο από τον αρχικό, και κατόπιν μεταφορά σε ειδικές στήλες (Purelink PCR Purification Kit) για την προσρόφηση του DNA στη στήλη. Μετά από φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές για 1 min και απομάκρυνση του διαλύματος της φυγοκέντρησης, ακολουθεί πλύση της στήλης με προσθήκη 650 μ L ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει αιθανόλη (Wash Buffer). Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές για 1 min και έπειτα ακολουθεί μία ακόμη φυγοκέντρηση (14.000 στροφές για 3 min), χωρίς την προσθήκη άλλου διαλύματος, με σκοπό την απομάκρυνση υπολειμμάτων αιθανόλης από την στήλη. Στο τελευταίο στάδιο, η στήλη μεταφέρεται σε φιαλίδιο των 1.5 mL, προστίθενται σε αυτή 30 μ L διαλύματος έκλουσης (10 Mm Tris-HCL, pH 8.5) και μετά από επώαση 1 min, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές για 2 min.

Για την απομάκρυνση τυχόν παραπροϊόντων, αντί της παραπάνω μεθόδου, ο καθαρισμός πραγματοποιείται με τη χρήση του PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen). Αρχικά, το προϊόν της PCR ηλεκτροφορείται για 50 min και κατόπιν τοποθετείται σε μηχανήμα που εκπέμπει υπεριώδες φως (UV transilluminator, UVITEC, Cat.No. M031308), προκειμένου να απομονωθεί με νυστέρι η επιθυμητή δέσμη. Ακολουθεί μεταφορά της σε φιαλίδιο στο οποίο προστίθεται το διάλυμα L3 (Gel Solubilization Buffer) σε όγκο τριπλάσιο από αυτόν της γέλης που απομονώθηκε και έπειτα επώαση σε υδατόλουτρο, στους 50°C για 20 min [κατά τη διάρκεια της επώασης πραγματοποιούμε ανάδευση (vortex) ανά 3 min, προκειμένου να διαλυθεί πλήρως η γέλη]. Στη συνέχεια προσθέτουμε στο φιαλίδιο έναν όγκο ισοπροπανόλης, αναδεύουμε και μεταφέρουμε το περιεχόμενο σε ειδική στήλη (Quick Gel Extraction Column, Invitrogen) που περιέχει μεμβράνη, ειδική για τη δέσμευση του DNA. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 1 min, απομάκρυνση του διαλύματος της φυγοκέντρησης και προσθήκη 500 μ L διαλύματος πλύσης (Wash Buffer, W1) που περιέχει αιθανόλη. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 1 min και ακολουθεί ακόμη μία, χωρίς την προσθήκη άλλου διαλύματος, στις 14.000 στροφές για 3 min, προκειμένου να απομακρυνθούν υπολείμματα του διαλύματος πλύσης και της αιθανόλης. Τέλος, η στήλη μεταφέρεται σε φιαλίδιο των 1.5 mL, προστίθενται σε αυτή 30 μ L διαλύματος έκλουσης (Elution Buffer, E5) και μετά από επώαση 1 min, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 1 min.

Και στις δύο μεθόδους τα καθαρισμένα προϊόντα ανακτώνται σε τελικό όγκο περίπου 28 μ L και κατόπιν ηλεκτροφορούνται, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, για τον έλεγχο και τον

προσδιορισμό της ποσότητας και της ποιότητάς τους. Τα καθαρισμένα προϊόντα PCR αποθηκεύονται στους -20°C, μέχρι να πραγματοποιηθεί η ανάλυση της αλληλουχίας τους.

3.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΒΑΣΕΩΝ ΚΑΤΑ SANGER

Για τη μελέτη των πολυμορφισμών του *TNFRSF13B/TACI* πραγματοποιήθηκε ανάλυση αλληλουχίας βάσεων, η οποία απαιτούσε τη χρήση ειδικού kit (Applied Biosystems, Big Dye Terminator V 3.1 Cycle Sequencing kit) και γινόταν στο γενετικό αναλυτή ABI 3730 XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για τη συσχέτιση των μεταβλητών της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία χ^2 (chi square test) με τη διόρθωση κατά Yates. Όπου κρίθηκε αναγκαίο χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση κατά Fisher. Στατιστικά σημαντική θεωρήθηκε η απόκλιση όταν $p < 0,05$.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ανάλυση αλληλουχίας βάσεων του γονιδίου *TNFRSF13B/TACI* στους ασθενείς με CRSwNP, αποκάλυψε την ύπαρξη δύο παρανοηματικών (missense) μεταλλάξεων, τριών σιωπηλών πολυμορφισμών και τεσσάρων ιντρονικών αντικαταστάσεων που ήδη έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία.

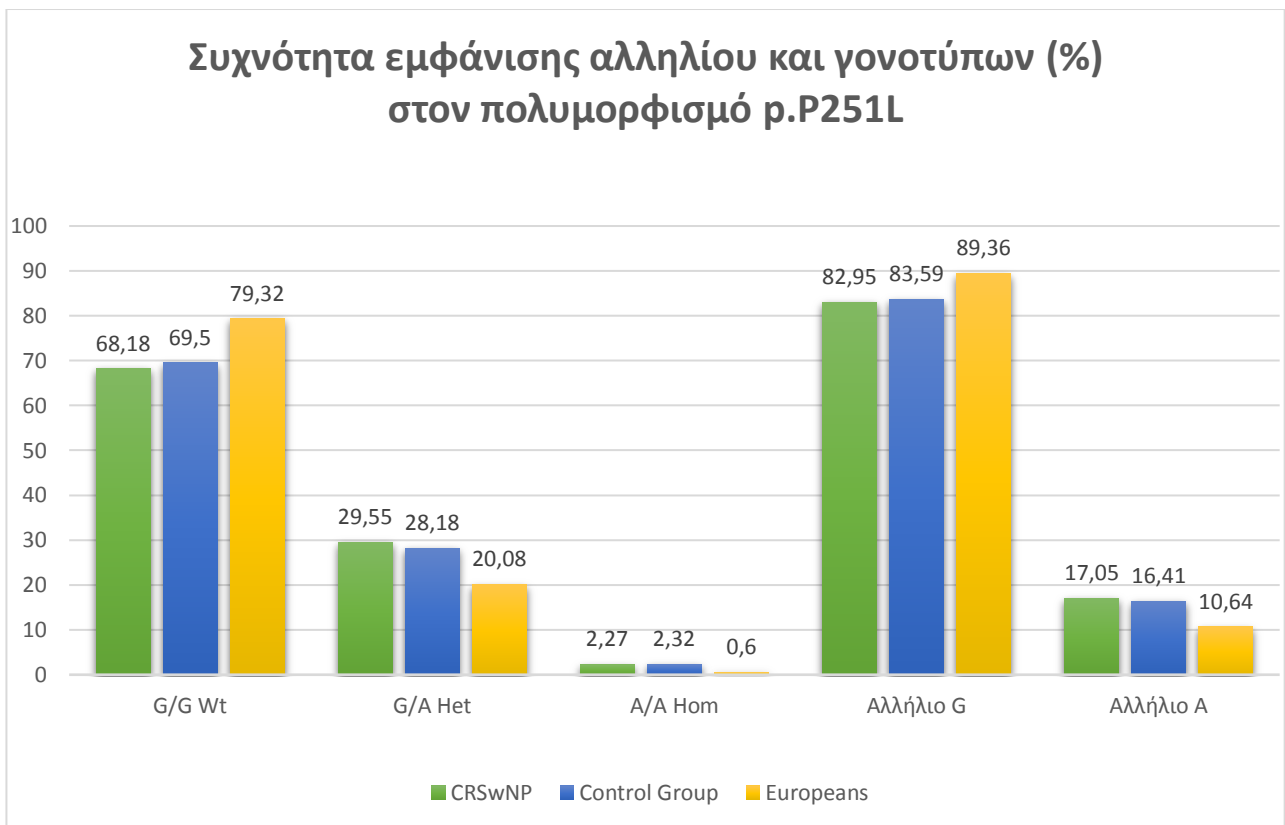
Πιο συγκεκριμένα δύο ασθενείς εμφάνιζαν τον πολυμορφισμό p.V220A (rs56063729), ενώ ο πολυμορφισμός p.P251L (rs34562254) ήταν παρόν σε δεκατέσσερις ασθενείς. Όλοι οι ασθενείς ήταν ετεροζυγώτες για τις προαναφερόμενες γενετικές βλάβες με μοναδική εξαίρεση έναν ασθενή ο οποίος ήταν ομόζυγος για τον πολυμορφισμό p.P251L.

Στην ομάδα ελέγχου των υγιών η συχνότητα αλληλίου για τους πολυμορφισμούς p.P251L και p.V220A ήταν 16,41% και 4,63% αντίστοιχα. Συγκεκριμένα έξι άτομα εμφάνιζαν ομοζυγωτία για τον πολυμορφισμό p.P251L, ένα άτομο για τον πολυμορφισμό p.V220A και πέντε άτομα εμφάνιζαν ετεροζυγωτία και για τους δύο πολυμορφισμούς.

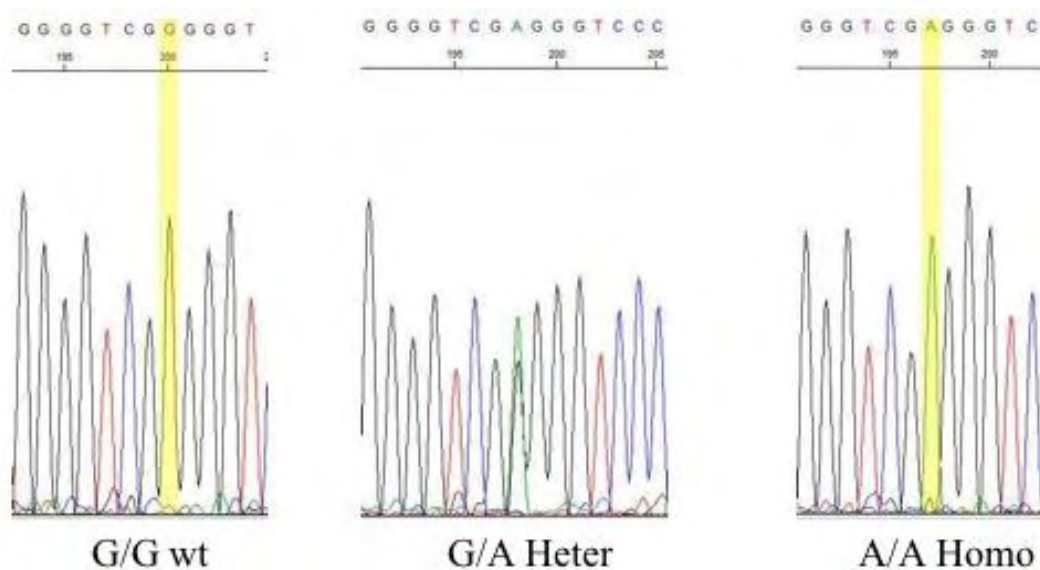
Όσον αφορά στον πολυμορφισμό p.P251L, η συχνότητα του αλληλίου A είναι παρόμοια στους ασθενείς με CRSwNP και την ομάδα ελέγχου. Ωστόσο φαίνεται πως η συχνότητα στον ελληνικό πληθυσμό είναι υψηλότερη από εκείνη του ευρωπαϊκού όσον αφορά τους ασθενείς με CRSwNP ($p=0,076$) αλλά και τον ελληνικό γενικό πληθυσμό ($p=0,0019$). Η συχνότητα εμφάνισης αλληλίου και γονοτύπων του πολυμορφισμού p.P251L παρουσιάζονται στον Πίνακα 9 και την Εικόνα 10. Ενδεικτικό αποτέλεσμα από τη μελέτη δειγμάτων για την παρανοηματική μετάλλαξη p.P251L μετά από ανάλυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και αλληλούχιση (sequencing) φαίνεται στην Εικόνα 11.

Πίνακας 9: Συχνότητα εμφάνισης αλληλίου και γονοτύπων στον πολυμορφισμό p.P251L σε ασθενείς με CRSwNP, στην ομάδα ελέγχου και τους Ευρωπαίους (από: www.ensembl.org)

p.P251L (rs34562254)			
	CRSwNP (v=44)	Control Group (v=259)	Europeans (v=503)
G/G wt	30 (68,18%)	180 (69,50%)	399 (79,32%)
G/A Heter	13 (29,55%)	73 (28,18%)	101 (20,08%)
A/A Homo	1 (2,27%)	6 (2,32%)	3 (0,60%)
Αλληλίο G	73 (82,95%)	433 (83,59%)	899 (89,36%)
Αλληλίο A	15 (17,05%)	85 (16,41%)	107 (10,64%)



Εικόνα 10: Συχνότητα εμφάνισης αλληλίου και γονοτύπων στον πολυμορφισμό p.P251L σε ασθενείς με CRSwNP, στην ομάδα ελέγχου και τους Ευρωπαίους (από www.ensembl.org)

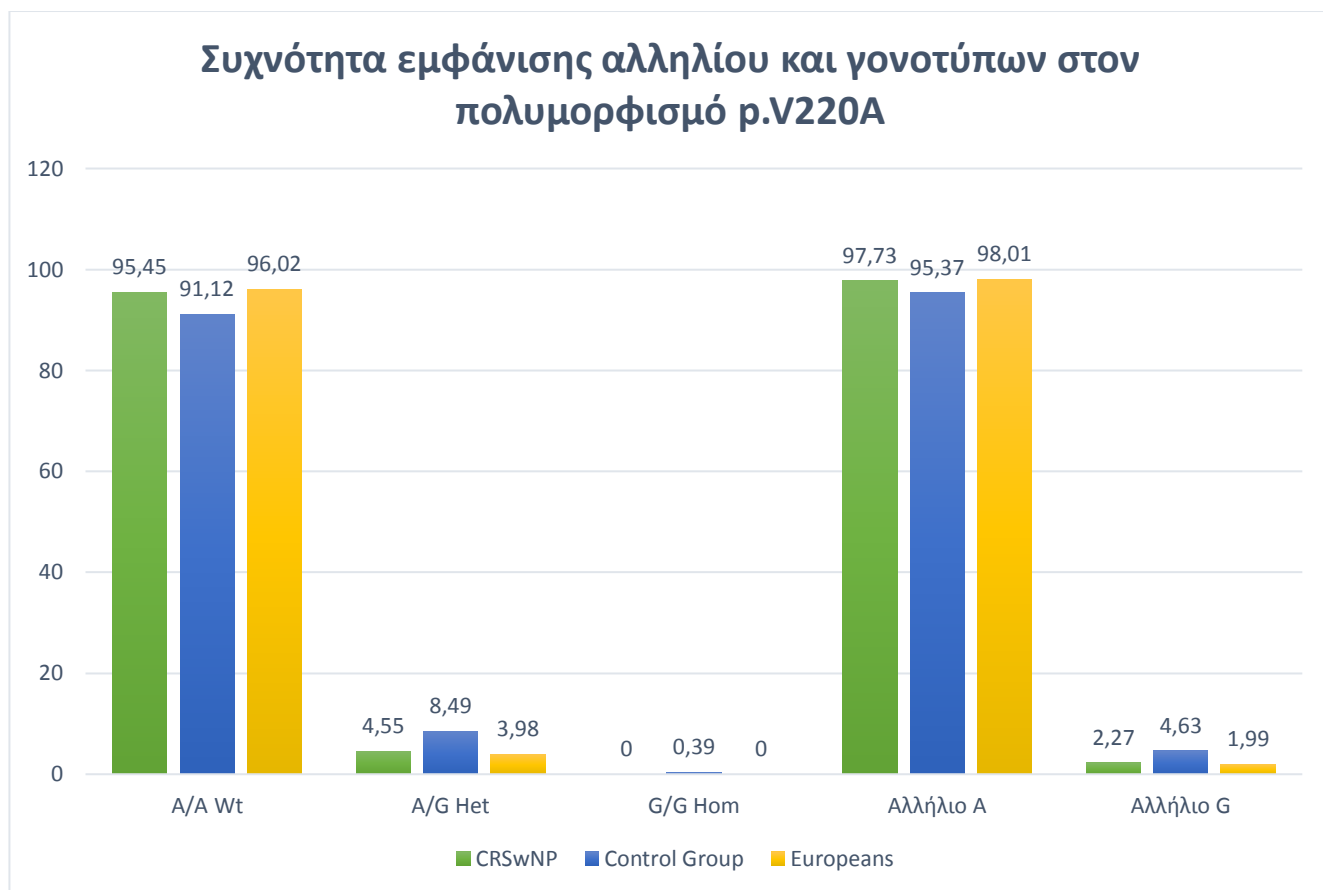


Εικόνα 11: Ενδεικτικά αποτελέσματα από τη μελέτη δειγμάτων για τον κοινό πολυμορφισμό p.P251L μετά από ανάλυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και αλληλούχιση βάσεων (sequencing).

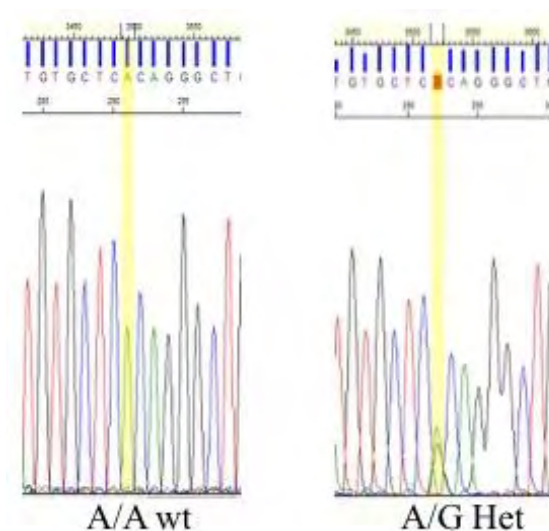
Όσον αφορά στον πολυμορφισμό p.V220A η συχνότητα εμφάνισης του αλληλίου G ήταν παρόμοια σε ασθενείς με CRSwNP και στον ευρωπαϊκό πληθυσμό. Ωστόσο στην ομάδα ελέγχου εμφανιζόταν σε διπλάσια συχνότητα, υποδεικνύοντας πως ο πολυμορφισμός V220A είναι συχνότερος στον ελληνικό γενικό πληθυσμό από τον ευρωπαϊκό ($p=0,005$). Η συχνότητα εμφάνισης αλληλίου και γονοτύπων στον πολυμορφισμό V220A φαίνεται στον πίνακα 10 και την Εικόνα 12. Ενδεικτικά αποτελέσματα από τη μελέτη δειγμάτων για τον κοινό πολυμορφισμό p.V220A μετά από ανάλυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και αλληλούχιση βάσεων (sequencing) φαίνονται στην Εικόνα 13.

Πίνακας 10: Συχνότητα εμφάνισης αλληλίου και γονοτύπων στον πολυμορφισμό p.V220A σε ασθενείς με CRSwNP, στην ομάδα ελέγχου και τους Ευρωπαίους (Από: www.ensembl.org).

p.V220A (rs56063729)			
	CRSwNP v=44	Control Group v=259	Europeans v=503
A/A wt	42 (95,45%)	236 (91,12%)	483 (96,02%)
A/G Heter	2 (4,55%)	22 (8,49%)	20 (3,98%)
G/G Homo	0 (0%)	1 (0,39%)	0 (0%)
Αλληλίο A	86 (97,73%)	494 (95,37%)	986 (98,01%)
Αλληλίο G	2 (2,27%)	24 (4,63%)	20 (1,99%)



Εικόνα 12: Συχνότητα εμφάνισης αλληλίου και γονοτύπων στον πολυμορφισμό p.V220A σε ασθενείς με CRSwNP, στην ομάδα ελέγχου και τους Ευρωπαίους (Από: www.ensembl.org).

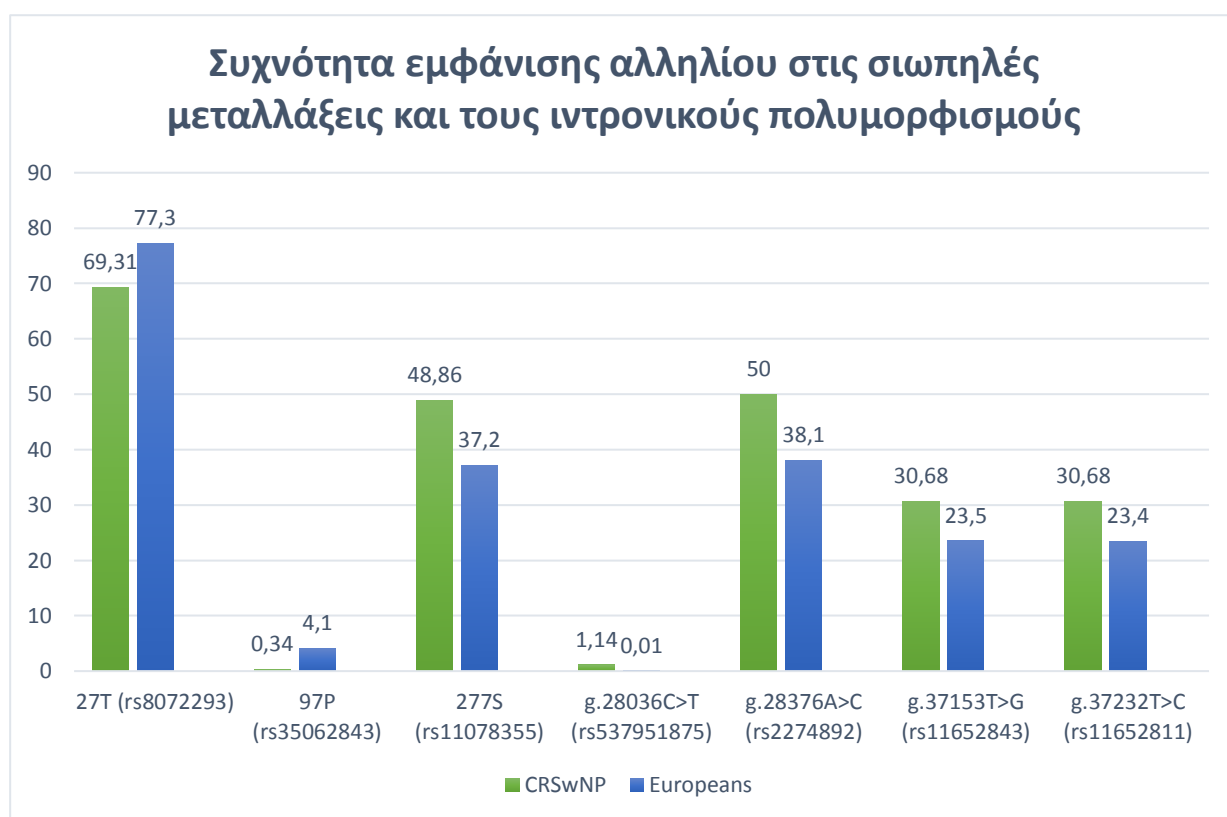


Εικόνα 13: Ενδεικτικά αποτελέσματα από τη μελέτη δειγμάτων για τον κοινό πολυμορφισμό p.V220A μετά από ανάλυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και αλληλούχιση βάσεων (sequencing).

Οι σιωπηλές μεταλλάξεις που αναγνωρίστηκαν στους ασθενείς ήταν οι p.Thr27= (rs8072293), p.Pro97= (rs35062843) και p.Ser277= (rs11078355) και οι ιντρονικοί πολυμορφισμοί ήταν οι c.445+25A>C (rs2274892), c.632-139T>G (rs11652843) και c.632-60T>C (rs11652811). Επίσης ένας ασθενής εμφάνιζε σε ετεροζυγωτία τον σπάνιο ιντρονικό πολυμορφισμό c.200-70C>T (g.28036C>T, rs537951875), ο οποίος στο γενικό πληθυσμό εμφανίζεται με ποσοστό αλληλίου 0,01%. Οι συχνότητες εμφάνισης των αλληλίων σε ασθενείς με CRSwNP και στον ευρωπαϊκό πληθυσμό παρουσιάζονται στον Πίνακα 11 και την Εικόνα 14.

Πίνακας 11: Συχνότητα εμφάνισης αλληλίου στις σιωπηλές μεταλλάξεις και τους ιντρονικούς πολυμορφισμούς σε ασθενείς με CRSwNP και τους Ευρωπαίους (Από: www.ensembl.org).

		c.DNA	g.DNA	Πρωτεΐνη	rs	Συχνότητα αλληλίου	
		Εξόνιο				CRSwNP	Europeans
Σιωπηλοί πολυμορφισμοί	2	c.81G>A	g.24525G>A	p.Thr27= (27T)	rs8072293	69,31%	77,3%
	3	c.291T>C	g.28197T>G	p.Pro97= (97P)	rs35062843	0,34%	4,1%
	5	c.831T>C	g.37491T>C	p.Ser277= (277S)	rs11078355	48,86%	37,2%
Ιντρονικές βλάβες	3	c.200-70C>T	g.28036C>T		rs537951875	1,14%	0,01%
	3	c.445+25A>C	g.28376A>C		rs2274892	50%	38,1%
	5	c.632-139T>G	g.37153T>G		rs11652843	30,68%	23,5%
	5	c.632-60T>C	g.37232T>C		rs11652811	30,68%	23,4%



Εικόνα 13: Συχνότητα εμφάνισης αλληλίου στις σιωπηλές μεταλλάξεις και τους ιντρονικούς πολυμορφισμούς σε ασθενείς με CRSwNP και τους Ευρωπαίους. Ο ιντρονικός πολυμορφισμός c.200-70C>T αναφέρεται σε ασθενείς με CRSwNP και στο γενικό πληθυσμό (Από: www.ensembl.org).

Με την ανάλυση χ^2 στη συχνότητα των πολυμορφισμών προέκυψε πως ο σιωπηλός πολυμορφισμός p.Ser277= (rs11078355) και οι ιντρονικοί πολυμορφισμοί c.445+25A>C (rs2274892), c.632-139T>G (rs11652843) και c.632-60T>C (rs11652811) εμφανίζονται σε στατιστικά σημαντική υψηλότερη συχνότητα στους ασθενείς με CRSwNP σε σχέση με τον ευρωπαϊκό πληθυσμό, με $p=0,0388$, $p=0,0053$, $p=0,0387$ και $p=0,0285$ αντίστοιχα.

Από τους πέντε ασθενείς που εμφάνιζαν ανθεκτική στη θεραπεία CRSwNP, οι δύο εμφάνιζαν την παρανοηματική μετάλλαξη p.P251L σε ετεροζυγωτία. Στους υπόλοιπους ασθενείς οι μεταλλάξεις ήταν σποραδικές και δε σχετιζόταν με την εμφάνιση αλλεργίας, άσθματος, τριάδας Samter ή άλλων δημογραφικών ή κλινικών χαρακτηριστικών.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο πλαίσιο της παρούσας πτυχιακής εργασίας, για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, αναλύθηκε το γονίδιο *TNFRSF13B/TACI* σε ασθενείς με CRSwNP. Ωστόσο δε διαπιστώθηκαν παθογόνες μεταλλάξεις που να μπορούν να συσχετιστούν με την εμφάνιση της νόσου.

Η αιτιοπαθογένεια της CRSwNP αποτελεί αντικείμενο έρευνας, μιας και οι μηχανισμοί που πυροδοτούν το σχηματισμό πολυπόδων δεν είναι πλήρως γνωστοί. Στα πλαίσια διερεύνησης ανοσοανεπαρκειών σε ασθενείς με CRS οι Chee et al. διαπίστωσαν πως 9,9% των ασθενών εμφάνιζαν CVID και 6,2% αυτών sIgAD (77). Ωστόσο οι Tran Khai Hoan et al. ελέγχοντας ανεπάρκεια των υποτάξεων IgG σε ασθενείς με CRSwNP δεν εντόπισαν κάποια συσχέτιση (78). Στους ασθενείς της δικής μας μελέτης δεν ανιχνεύτηκε καμία από τις παθογόνες μεταλλάξεις που σχετίζονται με τη CVID. Οι p.P251L και p.V220A είναι κοινói πολυμορφισμοί που δε σχετίζονται με την εμφάνιση αντισωματικής ανεπάρκειας

Σε ασθενείς με CRSwNP ανιχνεύονται υψηλά επίπεδα B κυττάρων και πλασματοκυττάρων καθώς επίσης και υψηλά επίπεδα IgA ανοσοσφαιρίνης σε δείγματα ρινικών πολυπόδων (67, 69). Οι Kato et al. αναγνώρισαν υψηλά επίπεδα BAFF σε ρινικούς πολύποδες και προχώρησαν στην υπόθεση πως αυτή η απορρύθμιση στα επίπεδα του BAFF σε ασθενείς με CRSwNP μπορεί να ενισχύσει την ηωσινοφιλική φλεγμονή διαμέσου επαγωγής της ισοτυπικής μεταστροφής και παραγωγής IgA από τα B κύτταρα στους ρινικούς πολύποδες. Στην ίδια μελέτη επίσης εντοπίστηκε αυξημένη έκφραση του υποδοχέα TACI σε δείγματα ιστών ρινικών πολυπόδων, η οποία εμφάνιζε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την έκφραση του συνδέτη BAFF (67).

Στη δική μας μελέτη ελέγξαμε πιθανές μεταλλάξεις του *TNFRSF13B/ TACI* σε ασθενείς με CRSwNP χωρίς ωστόσο να εντοπίσουμε μη νοσηματικές μεταλλάξεις. Οι παρανοηματικές μεταλλάξεις p.P251L και p.V220A που εντοπίστηκαν, αποτελούν κοινούς πολυμορφισμούς. Η επίπτωσή τους στην ομάδα των ασθενών, στην ομάδα ελέγχου, όπως επίσης και σε προηγούμενες μελέτες ήταν παρόμοιες (79). Ωστόσο η συχνότητα του πολυμορφισμού p.P251L στον ελληνικό πληθυσμό ήταν υψηλότερη σε σχέση με του ευρωπαϊκού πληθυσμού ($p < 0,05$). Επιπλέον οι σιωπηλές μεταλλάξεις p.Thr27= (rs8072293) και p.Pro97= (rs35062843) ανιχνεύτηκαν σε παρόμοια συχνότητα στην ομάδα των ασθενών σε σχέση με αυτή του ευρωπαϊκού πληθυσμού. Όσον αφορά στις ιντρονικές μεταλλάξεις που ανιχνεύτηκαν, οι c.445+25A>C (rs2274892), c.632-139T>G (rs11652843) και c.632-60T>C (rs11652811) αποτελούν κοινούς ιντρονικούς πολυμορφισμούς, όμως παρατηρήθηκε αυξημένη συχνότητα στους ασθενείς με CRSwNP σε σχέση με τον ευρωπαϊκό πληθυσμό, με στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$). Επίσης ένας ασθενής

εμφάνιζε σε ετεροζυγωτία τον σπάνιο ιντρονικό πολυμορφισμό c.200-70C>T (g.28036C>T, rs537951875), ο οποίος είναι ιδιαίτερα σπάνιος στο γενικό πληθυσμό και εμφανίζεται με συχνότητα αλληλίου 0,01%. Οι διαφορές αυτές, που προφανώς δεν έχουν κλινική σημασία, χρήζουν περαιτέρω επιβεβαίωσης και σε υγιή ελληνικό πληθυσμό.

Συμπερασματικά στη μελέτη μας, δεν προκύπτει συσχέτιση των μεταλλάξεων του *TNFRSF13B/ TACI* με την αιτιοπαθογένεια της CRSwNP. Παρόλα αυτά η μελέτη των συνδετών BAFF και APRIL, καθώς και των υπόλοιπων υποδοχέων τους ίσως να εμπλέκεται σε κάποιο βαθμό με την αιτιοπαθογένεια της CRSwNP και περισσότερες μελέτες είναι αναγκαίες για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, et al. EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology*. 2012;50(1):1-12.
2. Bachert C, Van Bruaene N, Toskala E, Zhang N, Olze H, Scadding G, et al. Important research questions in allergy and related diseases: 3-chronic rhinosinusitis and nasal polyposis - a GALEN study. *Allergy*. 2009;64(4):520-33.
3. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;131(4):959-71.
4. Zhang Y, Li J, Zhang YM, Zhang XM, Tao J. Effect of TACI signaling on humoral immunity and autoimmune diseases. *Journal of immunology research*. 2015;2015:247426.
5. Mackay F, Schneider P. TACI, an enigmatic BAFF/APRIL receptor, with new unappreciated biochemical and biological properties. *Cytokine & growth factor reviews*. 2008;19(3-4):263-76.
6. Mamara A, Germeis AE, Kompoti M, Palassopoulou M, Mandala E, Banti A, et al. TACI expression and signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of immunology research*. 2015;2015:478753.
7. Ng LG, Sutherland AP, Newton R, Qian F, Cachero TG, Scott ML, et al. B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells. *Journal of immunology*. 2004;173(2):807-17.
8. Yu G, Boone T, Delaney J, Hawkins N, Kelley M, Ramakrishnan M, et al. APRIL and TALL-1 and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity. *Nature immunology*. 2000;1(3):252-6.
9. Mackay F, Schneider P. Cracking the BAFF code. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(7):491-502.
10. Panchanathan R, Choubey D. Murine BAFF expression is up-regulated by estrogen and interferons: implications for sex bias in the development of autoimmunity. *Molecular immunology*. 2013;53(1-2):15-23.
11. Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, et al. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nature immunology*. 2002;3(9):822-9.
12. Lopez-Fraga M, Fernandez R, Albar JP, Hahne M. Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase. *EMBO reports*. 2001;2(10):945-51.
13. Tobon GJ, Izquierdo JH, Canas CA. B lymphocytes: development, tolerance, and their role in autoimmunity-focus on systemic lupus erythematosus. *Autoimmune diseases*. 2013;2013:827254.
14. Shaw CJ, Lupski JR. Non-recurrent 17p11.2 deletions are generated by homologous and non-homologous mechanisms. *Human genetics*. 2005;116(1-2):1-7.
15. Bacchelli C, Buckridge S, Thrasher AJ, Gaspar HB. Translational mini-review series on immunodeficiency: molecular defects in common variable immunodeficiency. *Clinical and experimental immunology*. 2007;149(3):401-9.
16. von Bulow GU, Bram RJ. NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Science*. 1997;278(5335):138-41.
17. Chang SK, Arendt BK, Darce JR, Wu X, Jelinek DF. A role for BLyS in the activation of innate immune cells. *Blood*. 2006;108(8):2687-94.
18. Schatorje EJ, Gemen EF, Driessen GJ, Leuvenink J, van Hout RW, van der Burg M, et al. Age-matched reference values for B-lymphocyte subpopulations and CVID classifications in children. *Scandinavian journal of immunology*. 2011;74(5):502-10.

19. Kaur K, Chowdhury S, Greenspan NS, Schreiber JR. Decreased expression of tumor necrosis factor family receptors involved in humoral immune responses in preterm neonates. *Blood*. 2007;110(8):2948-54.
20. Liu Y, Xu L, Opalka N, Kappler J, Shu HB, Zhang G. Crystal structure of sTALL-1 reveals a virus-like assembly of TNF family ligands. *Cell*. 2002;108(3):383-94.
21. Ingold K, Zumsteg A, Tardivel A, Huard B, Steiner QG, Cachero TG, et al. Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(9):1375-83.
22. Moreaux J, Sprynski AC, Dillon SR, Mahtouk K, Jourdan M, Ythier A, et al. APRIL and TACI interact with syndecan-1 on the surface of multiple myeloma cells to form an essential survival loop. *European journal of haematology*. 2009;83(2):119-29.
23. Roschke V, Sosnovtseva S, Ward CD, Hong JS, Smith R, Albert V, et al. BlyS and APRIL form biologically active heterotrimers that are expressed in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Journal of immunology*. 2002;169(8):4314-21.
24. Bossen C, Cachero TG, Tardivel A, Ingold K, Willen L, Dobles M, et al. TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts. *Blood*. 2008;111(3):1004-12.
25. Baud V, Liu ZG, Bennett B, Suzuki N, Xia Y, Karin M. Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes & development*. 1999;13(10):1297-308.
26. von Bulow GU, van Deursen JM, Bram RJ. Regulation of the T-independent humoral response by TACI. *Immunity*. 2001;14(5):573-82.
27. Yan M, Wang H, Chan B, Roose-Girma M, Erickson S, Baker T, et al. Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice. *Nature immunology*. 2001;2(7):638-43.
28. Lee JJ, Ozcan E, Rauter I, Geha RS. Transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor mutations in common variable immunodeficiency. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2008;8(6):520-6.
29. Berglund LJ, Jones GJ, Murali R, Fulcher DA. TACI mutation with invasive polyclonal CD8+ T-cell lymphoproliferation in a patient with common variable immunodeficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;117(4):870-7.
30. Castigli E, Wilson SA, Scott S, Dedeoglu F, Xu S, Lam KP, et al. TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(1):35-9.
31. Castigli E, Scott S, Dedeoglu F, Bryce P, Jabara H, Bhan AK, et al. Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(11):3903-8.
32. Chu VT, Enghard P, Riemekasten G, Berek C. In vitro and in vivo activation induces BAFF and APRIL expression in B cells. *Journal of immunology*. 2007;179(9):5947-57.
33. Xu S, Lam KP. B-cell maturation protein, which binds the tumor necrosis factor family members BAFF and APRIL, is dispensable for humoral immune responses. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(12):4067-74.
34. Castigli E, Wilson S, Garibyan L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L, et al. Reexamining the role of TACI coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Nature genetics*. 2007;39(4):430-1.
35. Salzer U, Bacchelli C, Buckridge S, Pan-Hammarstrom Q, Jennings S, Lougaris V, et al. Relevance of biallelic versus monoallelic TNFRSF13B mutations in distinguishing disease-causing from risk-increasing TNFRSF13B variants in antibody deficiency syndromes. *Blood*. 2009;113(9):1967-76.
36. Castigli E, Wilson SA, Garibyan L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L, et al. TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nature genetics*. 2005;37(8):829-34.

37. Salzer U, Chapel HM, Webster AD, Pan-Hammarstrom Q, Schmitt-Graeff A, Schlesier M, et al. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nature genetics*. 2005;37(8):820-8.
38. Mohammadi J, Liu C, Aghamohammadi A, Bergbreiter A, Du L, Lu J, et al. Novel mutations in TACI (TNFRSF13B) causing common variable immunodeficiency. *Journal of clinical immunology*. 2009;29(6):777-85.
39. Zhang L, Radigan L, Salzer U, Behrens TW, Grimbacher B, Diaz G, et al. Transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor mutations in common variable immunodeficiency: clinical and immunologic outcomes in heterozygotes. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2007;120(5):1178-85.
40. Garibyan L, Lobito AA, Siegel RM, Call ME, Wucherpfennig KW, Geha RS. Dominant-negative effect of the heterozygous C104R TACI mutation in common variable immunodeficiency (CVID). *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(6):1550-7.
41. Romberg N, Chamberlain N, Saadoun D, Gentile M, Kinnunen T, Ng YS, et al. CVID-associated TACI mutations affect autoreactive B cell selection and activation. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(10):4283-93.
42. He B, Chadburn A, Jou E, Schattner EJ, Knowles DM, Cerutti A. Lymphoma B cells evade apoptosis through the TNF family members BAFF/BLyS and APRIL. *Journal of immunology*. 2004;172(5):3268-79.
43. Kern C, Cornuel JF, Billard C, Tang R, Rouillard D, Stenou V, et al. Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood*. 2004;103(2):679-88.
44. Endo T, Nishio M, Enzler T, Cottam HB, Fukuda T, James DF, et al. BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF-kappaB pathway. *Blood*. 2007;109(2):703-10.
45. Bojarska-Junak A, Hus I, Chocholska S, Wasik-Szczepanek E, Sieklucka M, Dmoszynska A, et al. BAFF and APRIL expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with biological and clinical features. *Leukemia research*. 2009;33(10):1319-27.
46. Planelles L, Castillo-Gutierrez S, Medema JP, Morales-Luque A, Merle-Beral H, Hahne M. APRIL but not BLyS serum levels are increased in chronic lymphocytic leukemia: prognostic relevance of APRIL for survival. *Haematologica*. 2007;92(9):1284-5.
47. Chiu A, Xu W, He B, Dillon SR, Gross JA, Sievers E, et al. Hodgkin lymphoma cells express TACI and BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL. *Blood*. 2007;109(2):729-39.
48. Novak AJ, Darce JR, Arendt BK, Harder B, Henderson K, Kindsvogel W, et al. Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival. *Blood*. 2004;103(2):689-94.
49. Novak AJ, Grote DM, Stenson M, Ziesmer SC, Witzig TE, Habermann TM, et al. Expression of BLyS and its receptors in B-cell non-Hodgkin lymphoma: correlation with disease activity and patient outcome. *Blood*. 2004;104(8):2247-53.
50. Moreaux J, Cremer FW, Reme T, Raab M, Mahtouk K, Kaukel P, et al. The level of TACI gene expression in myeloma cells is associated with a signature of microenvironment dependence versus a plasmablastic signature. *Blood*. 2005;106(3):1021-30.
51. Seshasayee D, Valdez P, Yan M, Dixit VM, Tumas D, Grewal IS. Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLyS receptor. *Immunity*. 2003;18(2):279-88.
52. Speletas M, Salzer U, Florou Z, Petinaki E, Daniil Z, Bardaka F, et al. Heterozygous alterations of TNFRSF13B/TACI in tonsillar hypertrophy and sarcoidosis. *Clinical & developmental immunology*. 2013;2013:532437.

53. Knight AK, Radigan L, Marron T, Langs A, Zhang L, Cunningham-Rundles C. High serum levels of BAFF, APRIL, and TACI in common variable immunodeficiency. *Clinical immunology*. 2007;124(2):182-9.
54. Kyrtsolis MC, Sarris K, Kouliris E, Maltezas D, Nikolaou E, Angelopoulou MK, et al. Serum soluble TACI, a BlyS receptor, is a powerful prognostic marker of outcome in chronic lymphocytic leukemia. *BioMed research international*. 2014;2014:159632.
55. Navarra SV, Guzman RM, Gallacher AE, Hall S, Levy RA, Jimenez RE, et al. Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2011;377(9767):721-31.
56. Rosenfeld RM, Piccirillo JF, Chandrasekhar SS, Brook I, Ashok Kumar K, Kramper M, et al. Clinical practice guideline (update): adult sinusitis. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2015;152(2 Suppl):S1-S39.
57. Snidvongs K, Lam M, Sacks R, Earls P, Kalish L, Phillips PS, et al. Structured histopathology profiling of chronic rhinosinusitis in routine practice. *International forum of allergy & rhinology*. 2012;2(5):376-85.
58. Amorim MM, Araruna A, Caetano LB, Cruz AC, Santoro LL, Fernandes AL. Nasal eosinophilia: an indicator of eosinophilic inflammation in asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2010;40(6):867-74.
59. Soler ZM, Sauer DA, Mace J, Smith TL. Relationship between clinical measures and histopathologic findings in chronic rhinosinusitis. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2009;141(4):454-61.
60. Tosun F, Arslan HH, Karslioglu Y, Devci MS, Durmaz A. Relationship between postoperative recurrence rate and eosinophil density of nasal polyps. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*. 2010;119(7):455-9.
61. Lam K, Kern RC, Luong A. Is there a future for biologics in the management of chronic rhinosinusitis? *International forum of allergy & rhinology*. 2016;6(9):935-42.
62. Benninger MS, Ferguson BJ, Hadley JA, Hamilos DL, Jacobs M, Kennedy DW, et al. Adult chronic rhinosinusitis: definitions, diagnosis, epidemiology, and pathophysiology. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2003;129(3 Suppl):S1-32.
63. Sasama J, Sherries DA, Shin SH, Kephart GM, Kern EB, Ponikau JU. New paradigm for the roles of fungi and eosinophils in chronic rhinosinusitis. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*. 2005;13(1):2-8.
64. Roca-Ferrer J, Garcia-Garcia FJ, Pereda J, Perez-Gonzalez M, Pujols L, Alobid I, et al. Reduced expression of COXs and production of prostaglandin E(2) in patients with nasal polyps with or without aspirin-intolerant asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;128(1):66-72 e1.
65. Van Crombruggen K, Zhang N, Gevaert P, Tomassen P, Bachert C. Pathogenesis of chronic rhinosinusitis: inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;128(4):728-32.
66. Bachert C, Zhang N, Patou J, van Zele T, Gevaert P. Role of staphylococcal superantigens in upper airway disease. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2008;8(1):34-8.
67. Kato A, Peters A, Suh L, Carter R, Harris KE, Chandra R, et al. Evidence of a role for B cell-activating factor of the TNF family in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2008;121(6):1385-92, 92 e1-2.
68. Morinaka S, Nakamura H. Inflammatory cells in nasal mucosa and nasal polyps. *Auris, nasus, larynx*. 2000;27(1):59-64.
69. Van Zele T, Gevaert P, Holtappels G, van Cauwenberge P, Bachert C. Local immunoglobulin production in nasal polyposis is modulated by superantigens. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2007;37(12):1840-7.

70. Smurthwaite L, Durham SR. Local IgE synthesis in allergic rhinitis and asthma. *Current allergy and asthma reports*. 2002;2(3):231-8.
71. Tan BK, Zirkle W, Chandra RK, Lin D, Conley DB, Peters AT, et al. Atopic profile of patients failing medical therapy for chronic rhinosinusitis. *International forum of allergy & rhinology*. 2011;1(2):88-94.
72. Meltzer EO, Hamilos DL, Hadley JA, Lanza DC, Marple BF, Nicklas RA, et al. Rhinosinusitis: Developing guidance for clinical trials. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2006;135(5 Suppl):S31-80.
73. Dubin MG, Liu C, Lin SY, Senior BA. American Rhinologic Society member survey on "maximal medical therapy" for chronic rhinosinusitis. *American journal of rhinology*. 2007;21(4):483-8.
74. Lal D, Scianna JM, Stankiewicz JA. Efficacy of targeted medical therapy in chronic rhinosinusitis, and predictors of failure. *American journal of rhinology & allergy*. 2009;23(4):396-400.
75. Smith KA, Smith TL, Mace JC, Rudmik L. Endoscopic sinus surgery compared to continued medical therapy for patients with refractory chronic rhinosinusitis. *International forum of allergy & rhinology*. 2014;4(10):823-7.
76. Smith TL, Kern R, Palmer JN, Schlosser R, Chandra RK, Chiu AG, et al. Medical therapy vs surgery for chronic rhinosinusitis: a prospective, multi-institutional study with 1-year follow-up. *International forum of allergy & rhinology*. 2013;3(1):4-9.
77. Chee L, Graham SM, Carothers DG, Ballas ZK. Immune dysfunction in refractory sinusitis in a tertiary care setting. *The Laryngoscope*. 2001;111(2):233-5.
78. Tran Khai Hoan N, Karmochkine M, Laccourreye O, Bonfils P. Nasal polyposis and immunoglobulin-G subclass deficiency. *European annals of otorhinolaryngology, head and neck diseases*. 2014;131(3):171-5.
79. Speletas M, Mamara A, Papadopoulou-Alataki E, Iordanakis G, Liadaki K, Bardaka F, et al. TNFRSF13B/TACI alterations in Greek patients with antibody deficiencies. *Journal of clinical immunology*. 2011;31(4):550-9.